

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl)
und
der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Alexander Berghaus)

***Tissue Engineering* mit porösen Polyethylenimplantaten:
Effekte einer Beschichtung mit Etanercept auf die Integration *in vivo***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Franziska Maria Sophia Ditz
aus Augsburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Sebastian Strieth

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Thomas Holzbach
Priv. Doz. Dr. Wenko Smolka

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2018

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	S.3-14
1.1 Poröses Polyethylen.....	S. 3-4
1.2 Experimentelle Extrazellulärmatrix.....	S. 5
1.3TNF- α -Inhibition.....	S. 6-7
1.4 Entzündung.....	S. 7-12
1.5 Fragestellung.....	S. 13-14
2 Material und Methoden.....	S.15-34
2.1 Verwendete Materialien.....	S.15-17
2.1.1 Implantate.....	S.15
2.1.2 Matrigel.....	S.15
2.1.3 Etanercept.....	S.16
2.1.4 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran.....	S.17
2.1.5 Rhodamin 6G.....	S.17
2.1.6 Molekularbiologische Reagenzien.....	S.17
2.2 Methoden.....	S.18-34
2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung.....	S.18
2.2.2 Präparation der Rückenhautkammer.....	S.18-20
2.2.3 Blutentnahme.....	S.21-22
2.2.4 Biomaterialimplantation.....	S. 22
2.2.5 Intravitalmikroskopie (IVM).....	S.22-24
2.2.6 Herzpunktion.....	S.25
2.2.7 Messung der mechanischen Integration in vivo.....	S.25-26
2.2.8 Herstellung der Gewebeproben.....	S.26
2.2.9 IVM – Auswertung.....	S.26-28
2.2.10 Analyse der Serumproben.....	S.29
2.2.11 Analyse der Gewebeproben.....	S.30-32
2.2.12 Statistik.....	S.32

2.2.13 Versuchsablauf.....	S.33-34
3 Ergebnisse.....	S.35-43
3.1 Angiogenese und Analyse der mikrohämodynamischen Messwerte.....	S.35-38
3.1.1 Gefäßdurchmesser.....	S.35-36
3.1.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	S.36
3.1.3 Funktionelle Gefäßdichte.....	S.37-38
3.2 Leukozyten-Endothelzellfunktion.....	S.38-40
3.2.1 Leukozytenfluss.....	S.38-39
3.2.2 Adhärente Leukozyten.....	S.39-40
3.3 Dynamische Desintegrationskraft.....	S.40-41
3.4 Analyse der Serumproben.....	S.41-43
3.4.1 IL-1 β	S.42
3.4.2 IL-6.....	S.43
3.5 Analyse der Gewebeproben.....	S.44
4 Diskussion.....	S.45-53
4.1 Diskussion der Methodik.....	S.45-48
4.1.1 Modell der transparenten Rückenhautkammer.....	S.45-46
4.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	S.46-48
4.2 Diskussion der Ergebnisse.....	S.48-53
4.2.1 Untersuchung der Angiogenese.....	S.48-49
4.2.2 Entzündungsantwort.....	S.50-52
4.2.3 Dynamische Desintegrationskraft.....	S.53
4.2.4 Ausblick.....	S.53
5 Textzusammenfassung.....	S.54
6 Abkürzungsverzeichnis.....	S.55-58
7 Literaturverzeichnis.....	S.58-67
8 Danksagung.....	S.68

1 Einleitung

1. 1 Poröses Polyethylen

Poröses Polyethylen zeichnet sich durch gute Biokompatibilität aus und unterstützt durch seine Porengröße von 100-200 µm das Einwachsen in das umliegende Gewebe. Die charakteristische Struktur des Materials wird durch einen patentierten Prozess erreicht. Polyethylengranulat wird dabei zusammengepresst, erhitzt bis an den Schmelzpunkt und dann in die gewünschte Form gebracht (Blaydon, Shepler, 2003). Poröses Polyethylen ist erhältlich in verschiedenen Konturenformen (Purdy, 1997). Es kann während Operationen auf praktikable Art und Weise verarbeitet und individualisiert werden: es ist gut schneidbar, erhitzbar und kann gut mit dem umliegenden Gewebe vernäht werden. Seit über 50 Jahren ist es zur Anwendung als Biomaterial beim Menschen zugelassen (Purdy, 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass es eine gute Stabilität bei traumatischer Krafteinwirkung und Narbenkontraktion besitzt (Mendelsohn et al., 2005). Bei der Verwendung sollte darauf geachtet werden, dass das Implantat nicht zu groß ist und vollständig und spannungsfrei in das vitale Gewebe eingebettet werden kann. Eine suffiziente Deckung ist von großer Bedeutung (Stelter et al., 2007). Seit Jahren wird poröses Polyethylen als Alternative zu autologem Rippenknorpel bei Ohrmuschelrekonstruktionen verwendet (Narges et al., 2014). Die Verwendung von Rippenknorpel hat den Nachteil, dass durch die Entnahme ein Hebedefekt verursacht wird, der zur Narbenentstehung führt. Aber die Verwendung von porösem Polyethylen ist nicht immer komplikationslos. Eine Extrusion des Implantats durch Nekrose des Weichgewebsmantels ist möglich. In diesem Fall ist häufig eine zusätzliche Operation zur erneuten Deckung erforderlich, wobei das nicht mehr sterile Implantat in der Regel entfernt werden muss. In einer klinischen Studie kam es bei Ohrmuschelrekonstruktionen recht häufig zu solchen Implantatinfektionen (Lee et al., 2010). Es wurde eine Revision unter Verwendung von autologem Rippenknorpel durchgeführt, da trotz Hebedefekt die geringsten Komplikationen bei der Rekonstruktion auftreten (Lee et al., 2010). Trotz der bekannten Limitationen bei der Verwendung von porösem Polyethylen, wird es seit vielen

Jahrzehnten sehr erfolgreich in der rekonstruktiven Gesichtschirurgie angewandt. Im Bereich von Nase, Ohr und Stirn kann es erfolgreich implantiert werden und somit knöcherne und knorpelige Strukturen ersetzen. Eine weitere klinische Studie berichtet von 106 Patienten, denen poröses Polyethylen zur Gesichtsrekonstruktion implantiert wurde (Niechajev 2012). Die häufigsten Indikationen waren eine Deformation der Nase (n=61), eine Kinnhypoplasie (n=33) und eine Wangenknochenhypoplasie (n=6). Von den 106 Implantaten aus porösem Polyethylen wurden einige während des Beobachtungszeitraums zurechtgeschnitten oder wieder entfernt. 97 (91%) blieben jedoch komplikationslos implantiert. In einer weiteren klinischen Studie erwies sich poröses Polyethylen als sichere und effiziente Möglichkeit zur Rekonstruktion der Schädelbasis (Liebelt et al., 2015). Dies kann nach Entfernung eines Hypophysentumors notwendig sein. Bei einer klinischen Untersuchung hierzu erhielten 200 Patienten Implantate. 136 bekamen Sellabodenplastiken aus porösem Polyethylen. Die übrigen Patienten erhielten autologe Nasenknochenimplantate. Bei beiden Gruppen waren Häufigkeit und Art der Komplikationen gleich. Poröses Polyethylen lieferte in einigen weiteren präklinischen und klinischen Studien erfolgsversprechende Langzeitergebnisse, hinsichtlich Schlüsselparametern der Biomaterialintegration - wie Vaskularisation und Entzündungsantwort (Berghaus et al., 1984, 1985). Da es eine große Anzahl an unterschiedlichen Implantationsmaterialien gibt, wurde bereits vor ca. 30 Jahren daran gedacht eine klinische Vergleichsstudie zwischen einzelnen Implantationsmaterialien zu starten (Berghaus et al., 1984). Auf der Suche nach dem „perfekten Implantat“ wurden andere Materialien wie Proplast, e-PTFE oder Silikon mit porösem Polyethylen verglichen. Die anderen Materialien waren im Vergleich dem porösen Polyethylen in Bezug auf Infektionsrate und Gewebetoleranz unterlegen. In einer weiteren Vergleichsstudie wurden Ratten subkutan Implantate aus e-PTFE oder porösem Polyethylen implantiert. Es zeigte sich, dass die Implantate aus porösem Polyethylen auf Grund ihrer Porengröße ein schnelleres Einwachsen von Gefäßen aufwiesen. Die Präsenz von gut vaskularisiertem Gewebe in und um das Implantat herum, scheint vor experimentell induzierten Infektionen zu schützen (Scafani et al., 1997). Eine andere klinische Studie beschäftigt sich mit den Komplikationen bei Nasenplastiken. Hier werden die häufigsten Implantationsmaterialien Silikon, e-PTFE und poröses Polyethylen miteinander verglichen. Berichtet wird über 581 Fälle bei denen Komplikationen auftraten. Davon waren 376 Implantate aus Silikon, 183 aus e-PTFE und nur 22 aus porösem Polyethylen (Kim et al., 2014).

1.2 Experimentelle Extrazellulärmatrix

Experimentelle Extrazellulärmatrix liegt definiert und kommerziell erhältlich in Form von Matrigel® (BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced, GFR, BD Biosciences, Heidelberg) vor. Es ist eine gelatineartige Proteinmischung, die man im Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarkom vorfindet. Die Hauptbestandteile von Matrigel sind Strukturproteine wie Laminin, Entactin und Kollagen. Es beinhaltet auch Wachstumsfaktoren, die die Differenzierung und Proliferation vieler Zelltypen unterstützen. Diese Matrix wird oft als Substrat für Zellkulturen verwendet. Eine Besonderheit besteht darin, dass Matrigel bei 4 °C flüssig ist und bei 37 °C aushärtet. Dies ermöglicht eine hohe Formstabilität in vivo nach Einbringen in einen lebenden Organismus. So kann beobachtet werden, dass Zellkulturen auf Matrigel® komplexe mikrovaskuläre Netzwerke ausbilden, was auf einer Plastikoberfläche nicht der Fall ist (Arnaoutova et al., 2009). Die Substanz wird zum Testen von Adhärenzproteinen bei Zell-Zell-Kontakten verwendet (Hughes et al., 2010, Benton et al., 2009). Zudem unterstützt sie die Ausbildung eines Endothelzellnetzwerks und ist damit hypothetisch für die geweberегenerierende Therapie geeignet (Lin Cl, et al., 2014; Yang et al., 2014).

In der vorliegenden Studie wurde Matrigel dazu verwendet, in Tierversuchen neue Gefäßbildung aus dem bereits existierenden Blutgefäßsystem im Implantatbett für poröses Polyethylen zu stimulieren. Eine angiogenesesteigernde Wirkung von Matrigel® ist bereits aus früheren Studien bekannt (Bonfil et al., 1994).

1.3 TNF- α -Inhibition

TNF- α -Inhibition ist derzeit in verschiedenen klinisch-therapeutischen Szenarien interessant. Normalerweise wird ein TNF- α -Inhibitor (Etanercept, Enbrel®, Wyeth-Ayerst Pharmaceutica Inc., PA, USA) zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen und der Psoriasis eingesetzt. Es ist ein gentechnologisch hergestelltes Protein, das zur Senkung verschiedener entzündungsinduzierender Zytokine (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-17 und MMP) führt (Erdemli et al., 2013). So konnte in einer tierexperimentellen Studie mit Ratten gezeigt werden, dass das nach einer Kopfverletzung freigesetzte TNF- α durch die Gabe von Etanercept blockiert werden kann. Die Entzündungsreaktion wurde dadurch signifikant verringert (Perez-Polo et al., 2015). Etanercept wirkt somit als kompetitiver Antagonist. Es blockiert die TNF- α -Aktivität, indem es kompetitiv bindet, bevor TNF- α an seinen natürlichen Rezeptor an der Zelloberfläche binden kann. Durch seine dimere Struktur ist die Bindungsaffinität von Etanercept zu Molekülen von TNF- α höher als die der natürlichen monomeren Formen des TNF- α -Rezeptors. Etanercept wurde bereits in anderen Biomaterialstudien erfolgreich eingesetzt. In einer Studie wurden zwei Trägersubstanzen (methoxypoly(ethylen glycol)-poly(epsilon-caprolacton)-methoxypoly(ethylen glycol) und poly(epsilon-caprolacton) getestet, die die Freisetzung von Etanercept bei rheumatischer Arthritis über einen längeren Zeitraum erlauben. Dazu wurden Mikropartikel mit glatter Oberfläche und mittlerem Durchmesser von ungefähr 5 μm mit beiden Polymeren vorbereitet. Das Etanercept befand sich eingekapselt in den Mikropartikeln. In vitro konnte gezeigt werden, dass die andauernde Freisetzung von Etanercept zu einer deutlichen Abnahme der proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17) führt. MPEG-PCL-MPEG, ein Copolymer von PCL, könnte somit möglicherweise einmal in Kombination mit Etanercept zur lokalen Behandlung von chronisch entzündlichen Arthritidem verwendet werden (Erdemli et al., 2014).

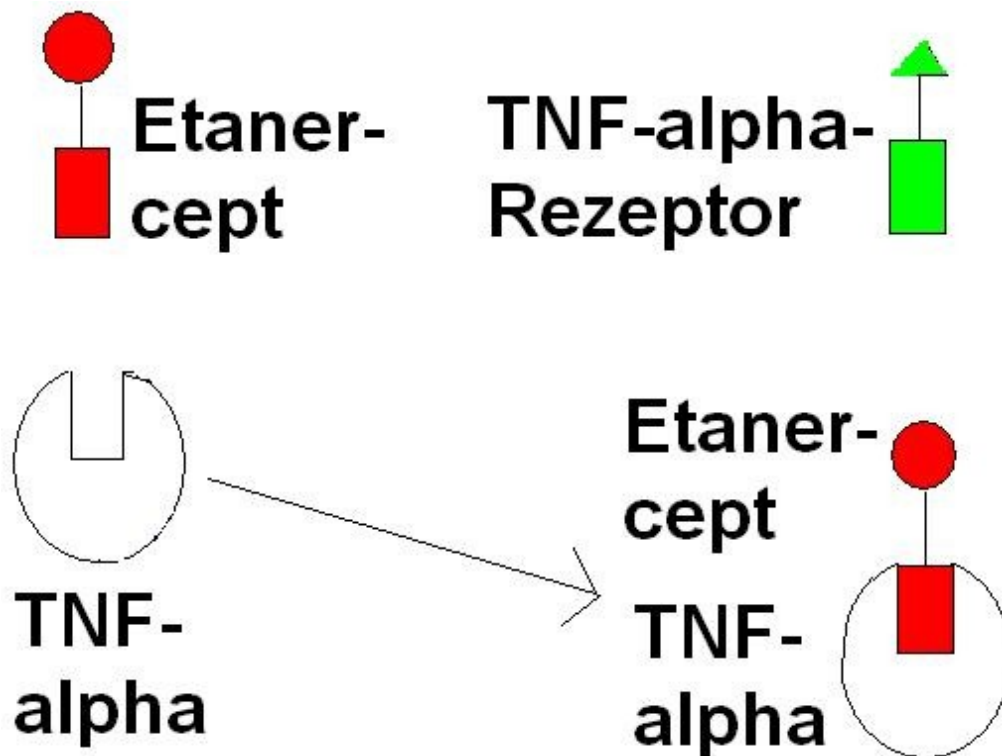


Abbildung 1:

Etanercept wirkt als kompetitiver Antagonist von TNF- α

1.4 Entzündung

Zytokine, die bei entzündlichen Erkrankungen auftreten, sind bei der Biomaterialintegration von großer funktioneller Bedeutung. Eine gewisse physiologische Entzündungsreaktion wird durch die Implantation von porösem Polyethylen in den gesunden Organismus regelhaft ausgelöst. Das Implantat wird vom Immunsystem als Fremdkörper identifiziert. Das umliegende Gewebe versucht in der Folge den Entzündungsreiz zu beseitigen. Dabei laufen folgende Reaktionen nacheinander ab: zunächst kommt es zu einer lokalen Durchblutungsstörung durch Reaktion des Gefäßbindegewebes auf Adrenalinausschüttung (Herbst et al., 2003). Die Arteriolen verengen sich und die Venolen erweitern sich. Danach folgt eine lokale Hyperämie, die durch Mediatoren wie Histamin, Prostaglandine oder Kinine ausgelöst wird. Sie hat eine Thrombozytenaggregation zur Folge. Die Permeabilität der Gefäßwände wird durch Gefäßmediatoren wie Histamin,

Prostaglandine, Kinine und Serotonin für wenige Minuten gesteigert. Durch die erhöhte Permeabilität gelangen Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten ins betroffene Gebiet, die von Interleukinen aktiviert werden. Es kommt dann möglicherweise zur Phagozytose der Fremdkörper. Außerdem reichern sich Mastzellen an.

Gewebe

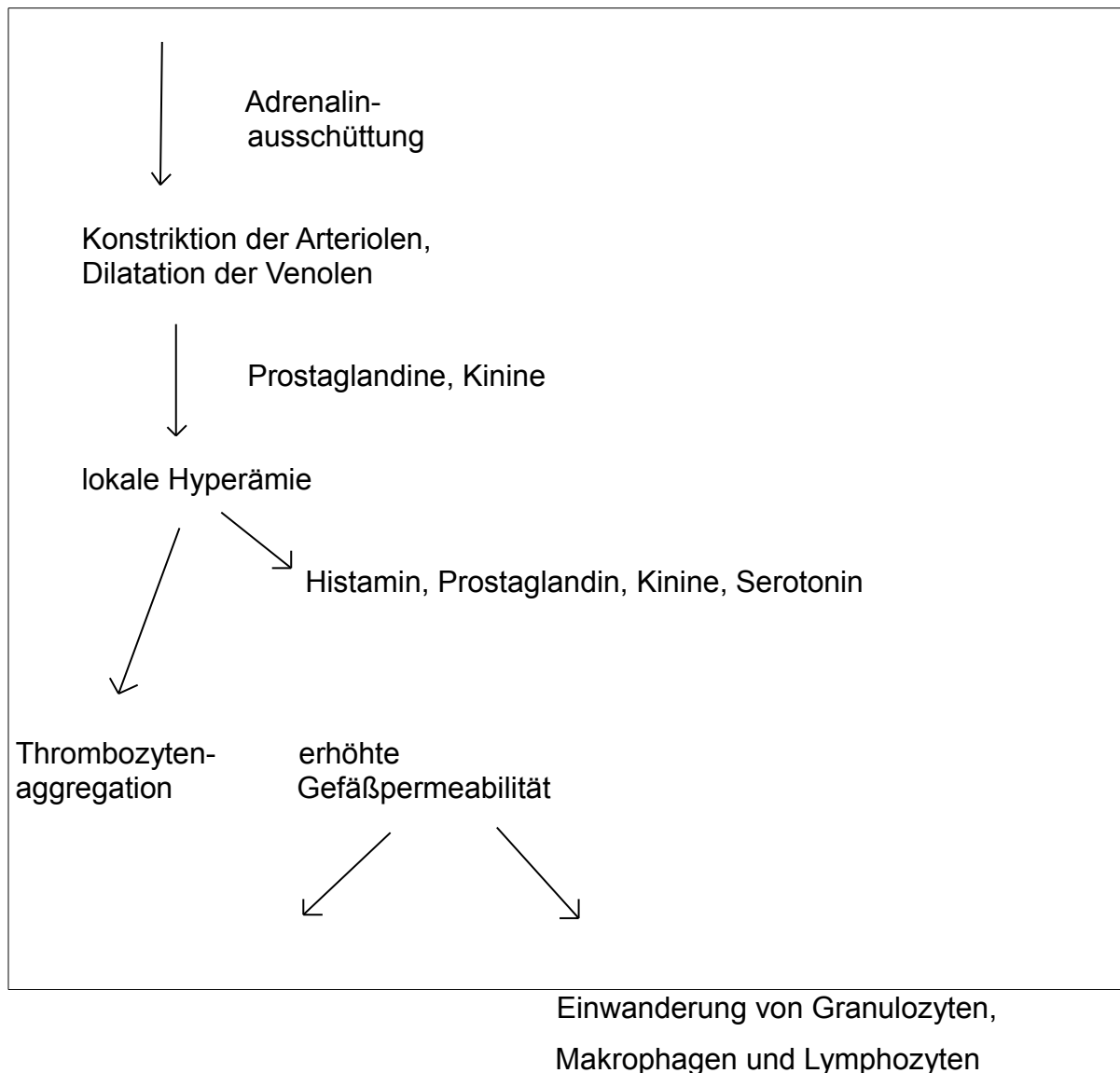


Abbildung 2:

Schematische Darstellung

Entstehung einer Entzündung im gesunden Gewebe nach Implantation eines Plättchens aus porösem Polyethylen

Das Vorhandensein einer Entzündung kann auch histologisch nachgewiesen werden (Teichgraeber et al., 1983). In einer tierexperimentellen Studie bei der Katzen Implantate aus porösem Polyethylen oder Proplast in das Mittelohr eingebracht wurden, konnte gezeigt werden, dass dabei charakteristische Reaktionen ablaufen. Zunächst waren die Implantate von einer fibrösen Kapsel umhüllt, die mit Epithelzellen ausgekleidet war. Histologisch waren Riesenzellen und Makrophagen nachweisbar. In einer anderen Studie wurde die Entzündungsantwort auf Implantate aus Titan und mit Hydroxylapatit ummanteltem Titan untersucht (Ryden et al., 2013). Bei beiden Gruppen fanden sich nach 24 h und nach 72 h erhöhte Werte für Interleukin-10, TNF-alpha, Lactat-Dehydrogenase und Monocyte-chemoattractant-protein-1 (MCP-1), sowie eine erhöhte Anzahl an Monozyten und polymorphkernigen Granulozyten.

Entzündungsprozesse können die Biomaterialintegration letztendlich erheblich beeinträchtigen. Im Extremfall führen Entzündungsprozesse bei der Implantation von Fremdmaterial zu einer chronischen Implantatabstoßung und zu einer Verschlechterung des Allgemeinzustands des Organismus. Daraus kann sich eine lebensbedrohliche systemische Entzündungsreaktion des Organismus (SIRS) entwickeln. Darunter versteht man eine Entzündungsreaktion, die gleichermaßen im gesamten Körper stattfindet unabhängig davon an welcher Stelle sie durch einen Reiz ausgelöst wurde.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene molekulare Botenstoffe gemessen, um Unterschiede in der Entzündungsreaktion feststellen zu können. Die Botenstoffe sind essentielle Zytokine bei der Beurteilung der Immunantwort auf ein Biomaterial. Dies wird unten bei der detaillierten Aufführung der einzelnen Zytokine deutlich.

Tabelle 1:

Wirkungsweise der einzelnen Botenstoffe

Zytokin	Synthese	Wirkung
TNF- α	wird v.a. von Makrophagen ausgeschüttet	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - multifunktionaler Signalstoff - regelt Aktivität verschiedener Immunzellen: kann Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine auslösen - essentieller Botenstoff bei Entzündungen (Rahman et al., 2006, Harris et al., 2010) und Biomaterialreaktionen
Interferon- γ	wird von T-Helferzellen (Typ 1) nach Kontakt mit Makrophagen gebildet	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - aktiviert Makrophagen und induziert antimikrobielle Peptide - wichtig für Abwehr intrazellulärer Infekte (z.B. Viren, Pilze) bzw. Tumoren - ist Teil der angeborenen Immunantwort und wird produziert bei Entzündungsreaktionen nach Biomaterialimplantation (Thiel et al., 2000)
Interleukin- 1β	wird v.a. von Blutmonozyten produziert	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - zentraler Botenstoff bei Antwort des Gastorganismus auf Fremdeinflüsse (erzeugt Pyrogene und führt somit zu Temperaturanstieg) - wichtig bei Fremdmaterialreaktionen im Blut (Dinarello 2005, Rivest et al., 2000)
Interleukin-2	wird von T-Helferzellen ausgeschüttet	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - wirkt autokrin auf sich selbst, aber auch auf natürliche Killerzellen und B-Lymphozyten als Wachstumsfaktor - stimuliert die Produktion anderer Interleukine, IFs und TNFs - Schlüsselstelle/Schnittstelle bei der Entzündungsantwort (Olejniczak et al., 2008)

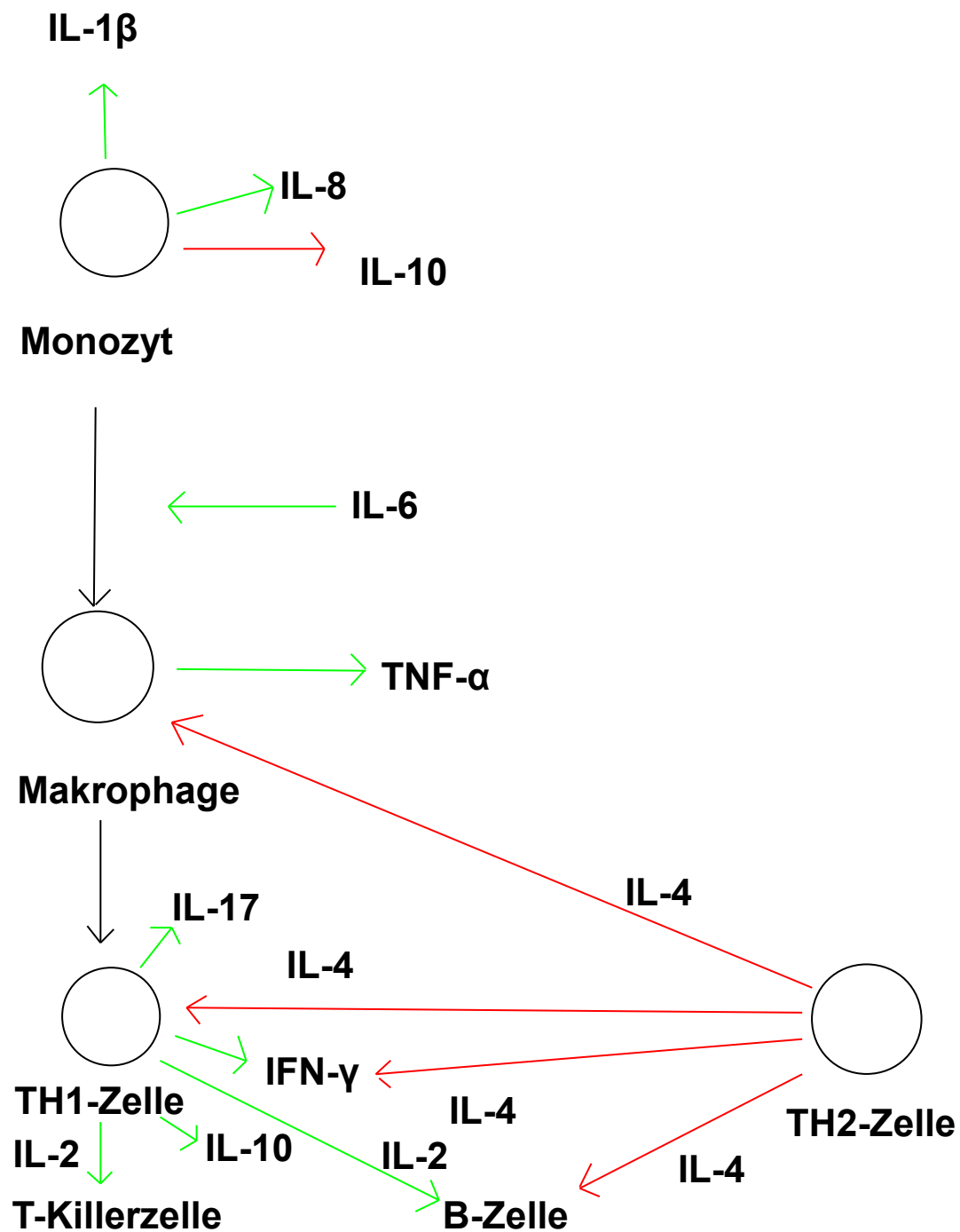
Interleukin-4	wird von T-Helferzellen (Typ 2) ausgeschüttet	<ul style="list-style-type: none"> - antiinflammatorisch - wichtig für Homöostase: verringert die Produktion von T-Helferzellen (Typ 1), Makrophagen und IFN-γ, stimuliert aktivierte B-Zellen - unterstützt Makrophagen, die vermehrt bei chronischer Entzündung und Wundreparatur (z.B. bei Biomaterialintegration) auftreten (Apte et al., 2008)
Interleukin-6	sehr schnell im Blut nachweisbar bei Entzündungen (Anstieg bis 1 ng/ml) (Jones 2005)	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - Aktivator der Akute-Phase-Proteine und Lymphozyten stimulierender Faktor - Monozyten werden durch IL-6 zu Makrophagen differenziert - Hormonwirkung: steigert Sekretion von Kortison, Somatotropin, Glucagon und Adrenalin - Schlüsselstellung im Übergang von Mechanismen der angeborenen zur erworbenen Immunität innerhalb des Entzündungsprozesses
Interleukin-8	wird v.a. von Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten und Epithelzellen produziert	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - Entzündungsmediator: rekrutiert chemotaktisch Leukozyten, v.a. neutrophile Granulozyten - Angiogenesefaktor: an Ausbildung und Neubildung von Blutgefäßen beteiligt durch Wirkung auf Endothelzellen (Brat et al., 2005)
Interleukin-10	wird von Monozyten und von T-Helferzellen (Typ1) sezerniert	<ul style="list-style-type: none"> - antiinflammatorisch - eines der wichtigsten antientzündlichen Zytokine, wirkt u.a. begrenzend und hemmend auf Abwehrvorgänge (z.B. beim septischen Schock) (Sky, Britton et al., 2013) - wesentlich an Immunmodulation im Intestinaltrakt beteiligt (Mangel: Morbus Crohn, Colitis ulcerosa)
Interleukin-17	Signalzytokin der T-Helferzellen (Typ 1)	<ul style="list-style-type: none"> - proinflammatorisch - Vermittlung des Entzündungsgeschehens an Fibroblasten und Neutrophilen-

		12 rekutierung - beteiligt an der Induktion der Entzündungsantwort (Kuby et al., 2007)
--	--	--

Abbildung 3:

Schematische Darstellung

Zusammenspiel der proinflammatorischen (grün) und antiinflammatorischen (rot) Zytokine bei Entzündung



1.5 Fragestellung

In vorliegender tierexperimenteller Studie sollten die Effekte einer TNF- α -Inhibition auf die Biomaterialintegration von porösem Polyethylen in vivo untersucht werden. Hierzu wurden Auswirkungen einer Beschichtung mit Etanercept in Matrigel® im Vergleich zu Matrigel®-Kontrollen -ohne Etanercept- analysiert.

Eine Studie in der Vergangenheit untersuchte bereits die Frage, wie man die Verträglichkeit von Implantaten aus porösem Polyethylen verbessern kann (Strieth et al., 2010). Hierzu wurde im Tierexperiment die Verträglichkeit von Implantaten aus porösem Polyethylen in Kombination mit extrazellulärer Matrix (Matrigel®) und VEGF getestet. Dabei konnte festgestellt werden, dass eine Beschichtung der Implantate mit extrazellulärer Matrix und VEGF zu einer Verringerung der initialen Entzündungsreaktion führt. In einer weiteren Studie wurden Implantate aus porösem Polyethylen mit Fibroblasten beschichtet. Damit konnte jedoch keine Verbesserung der Materialverträglichkeit herbeigeführt werden (Hussain et al., 2013).

Ein innovativer Ansatz war daher die Beschichtung von Implantaten aus porösem Polyethylen mit einem TNF- α -Inhibitor. Um herauszufinden, wie mikrovaskuläre und mechanische Integration beeinflusst werden, sollte nun in einer tierexperimentellen Folgestudie ein Teil der Implantate mit Etanercept beschichtet werden.

An den Versuchstieren mit den unterschiedlich vorbehandelten Implantaten wurden an 3 verschiedenen Zeitpunkten intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, an 2 verschiedenen Zeitpunkten sollten zusätzlich Blutproben und am Beobachtungsende Gewebeproben entnommen werden. Als Parameter der Angiogenese sollten Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und funktionelle Gefäßdichte gemessen werden. Zur Messung der entzündlichen Reaktion sollten Leukozyten-Endothelzellinteraktionen und Serum- und Gewebeproben quantitativ analysiert werden. Die mechanische Implantatintegration sollte in einem dynamischen Desintegrationsexperiment untersucht werden.

Folgende Fragen sollten somit beantwortet werden:

1. Welche Effekte hat eine TNF- α -Inhibition auf die Angiogenese bei porösen Polyethylenimplantaten in vivo?
2. Wie wird die entzündliche Reaktion durch TNF- α -Inhibition in vivo beeinflusst?
3. Welche Auswirkungen hat eine TNF- α -Inhibition auf die mechanische Integration in vivo?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Implantate

Als Implantatmaterial wurde poröses Polyethylen (MEDPOR®, Firma Porex Surgical, Inc., Newnan/GA, USA) mit einer Porengröße von 100-200 µm verwendet. Das Material wurde zu quadratischen Implantaten mit einer Größe von 4 mm x 4 mm x 0,1 mm zurecht geschnitten. Außerdem wurde eine zentrale Perforation bei den Implantaten angelegt, um später einen Kraftangriffspunkt für die mechanische Desintegration zu realisieren. Vor Implantation wurden die Biomaterialien dampfsterilisiert (134 °C, 2 bar, 1 h).

2.1.2 Matrigel

Matrigel Basalmembranmatrix (BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced, GFR, BD Biosciences, Heidelberg) besteht hauptsächlich aus Laminin, Kollagen IV, Entactin und verschiedenen Wachstumsfaktoren (s. Tab. 2).

Tabelle 2: Zusammensetzung des verwendeten Matrigels (GFRM, BD Matrigel Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences, Heidelberg)

GFRM Extrazellulärmatrixkomponenten (%)		GFRM Konzentration der Wachstumsfaktoren	
Laminin	60	VEGF (ng/mL)	1, 25
Kollagen IV	30	PDGF (pg/mL)	< 0, 5
Entactin	7	EGF (ng/mL)	< 0, 5
		IGF-1 (ng/mL)	5
		TGF-β (ng/mL)	1, 7
		NGF (ng/mL)	< 0, 2

2.1.3 Etanercept

Für die vorliegende Versuchsreihe wurde Etanercept (Enbrel, Wyeth-Ayerst Pharmaceutica Inc., PA, USA) in einer Konzentration von 25 mg/mL verwendet (genaue Zusammensetzung s. Tab. 3).

Tabelle 3: Zusammensetzung des verwendeten Enbrels (Enbrel, Wyeth-Ayerst Pharmaceutica Inc., PA, USA)

Enbrel	
Etanercept (mg)	25
Mannitol (mg)	40
Saccharose (mg)	10
Trometamol, TRIS (mg)	1,2
Wasser (mL)	1

Etanercept ist ein gentechnologisch hergestelltes Fusionsprotein. Es ist ein dimeres chimäres Protein, das aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen Tumornekrosefaktor-Rezeptors 2 (TNFR2/p75) verbunden mit der F_c-Untereinheit des IgG1-Antikörpers des Menschen besteht (Singh et al., 2009).

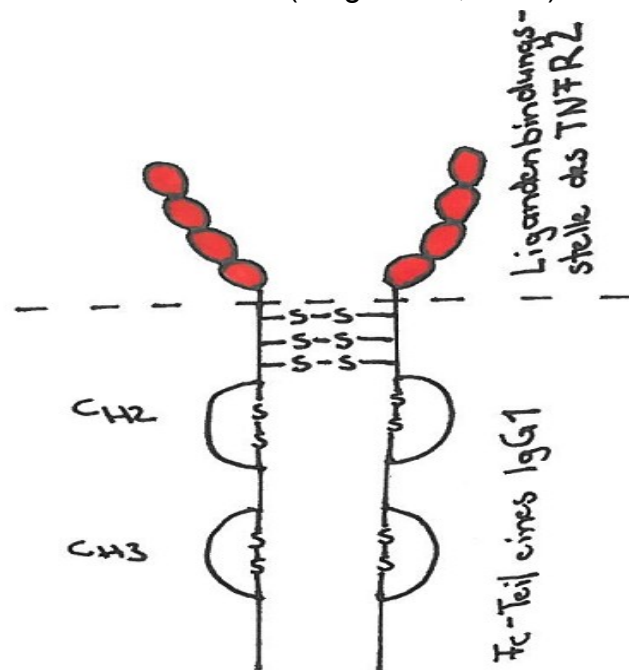


Abbildung 4: Etanercept

2.1.4 Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertes Dextran

FITC-markiertes Dextran ist ein fluoreszierender experimenteller Blutplasmamarker, der zur Analyse der Mikrozirkulation in vivo verwendet werden kann. Für die vorliegenden Versuche wurde hochmolekulares FITC-markiertes Dextran (MW 500KD; Sigma, Deisenhofen) verwendet. Das Konzentrationsverhältnis betrug 0,08-0,1 ml einer 5 %-Lösung in 0,9 % NaCl. Mit Hilfe eines Filters (Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) konnte anschließend die Gefäßneubildung analysiert werden.

2.1.5 Rhodamin 6G

Rhodamin 6G ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der nach intravenöser Applikation, in den Mitochondrien von Leukozyten im Blutstrom akkumuliert. Unter Verwendung eines Filters (Exzitation 510-560 nm, Emission 590 nm; Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) können Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in vivo untersucht werden: Man unterscheidet rollende und adhärente Leukozyten. Als rollende Leukozyten wurden diejenigen bezeichnet, die einen bestimmten Gefäßabschnitt in einem definierten Zeitintervall passieren. Das hier gewählte Zeitintervall betrug 30 Sekunden. Leukozyten, die über den gesamten Beobachtungszeitraum (30 Sekunden) an einer markierten Stelle der Gefäßwand haften, wurden als adhärente Leukozyten bezeichnet. 0,04-0,06 ml einer 0,1 %-Lösung in 0,9 % NaCl (Sigma, Deisenhofen, Dt) wurden dazu für jede einzelne Messung intravenös appliziert.

2.1.6 Molekularbiologische Reagenzien

Molekularbiologische Reagenzien (RNAlater, Invitrogen, Karlsruhe) wurden dazu verwendet, die RNA in Gewebe- und Biomaterialproben für spätere Analysen zu konservieren. Die Konservierung und Stabilisierung der Probe erfolgt hierbei durch die sofortige Inaktivierung der RNase.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die Tierexperimente wurden ordnungsgemäß durchgeführt. Die Experimente fanden im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin (WBex) im Zeitraum von Juli 2009 bis August 2010 statt. Eine entsprechende Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern lag im Vorhinein vor (Geschäftszeichen 55.2-1-54-2531-80-05). Es wurden ausschließlich männliche C57/B6 Mäuse verwendet. Die Tiere wurden über Charles River (Sulzfeld) bezogen und ab einem Mindestgewicht von 25g in die Versuchsreihen aufgenommen. Nach Präparation der Rückenhautkammer wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. Die Umgebungstemperatur betrug 24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 %. Die Beleuchtung erfolgte durch künstliches Licht in einem 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Mäuse hatten ununterbrochen freien Zugang zu Leitungswasser und Trockenfutter (Ssniff, Spezialdiäten GmbH, Soest).

2.2.2 Präparation der Rückenhautkammer

Um den Verlauf der Implantatintegration in vivo beobachten zu können, wurde das Modell der transparenten Rückenhautkammer verwendet. Dieses Modell wurde bereits wiederholt im Detail beschrieben (Dellian et al., 1996; Endrich et al., 1980; Lehr et al., 1993; Strieth et al., 2005). Die Rückenhautkammer besteht aus 2 symmetrischen Titanrahmen mit einer zentralen kreisrunden Aussparung. In diese kann ein Deckglas eingesetzt werden, das mit einem Sprengring fixiert wird. Zwischen den beiden Titanrahmen befindet sich die zu einer Hautfalte angehobene enthaarte Rückenhaul. Von dieser wird unter Vollnarkose in Form eines Kreises eine Schicht Dermis und subkutanes Bindegewebe abpräpariert. So kann nun die gegenüber liegende Hautschicht mit ihrer Gefäßversorgung durch das Fenster betrachtet werden. Durch Abnehmen des Deckglases kann man nun Polyethylen implantieren. Außerdem kann die Vaskularisierung über einen längeren Zeitraum am wachen Tier intravitalmikroskopisch beobachtet werden.

Detaillierte chirurgische Durchführung

Zunächst wurden die Tiere mit Ketamin (75 mg/kg i.m., Ketavet, Pharmacia GmbH, Erlangen) und Xylazin (25 mg/kg i.m., Rompun, Bayer, Leverkusen) narkotisiert. Anschließend wurde die Behaarung mit einem Langhaarrasierer (Aesculap, Tuttlingen) und Enthaarungscreme (Pilcamed, Schwarzkopf, Düsseldorf) entfernt. Danach wurde die Haut mit 70 % Alkohol gereinigt und desinfiziert. Während der gesamten Operation lagen die Tiere auf einer Wärmplatte um Auskühlen zu verhindern. Die Rückenhaut wurde angehoben und mit Hilfe von ausreichend Gegenlicht die arkadenförmigen Versorgungsgefäße der Haut aufgesucht. Diese wurden so positioniert, dass sie sich im hinteren Hautabschnitt befanden. Danach wurde zunächst der hintere Titanrahmen mit zwei Einzelknopfnähten (5.0 Seidenfäden; Ethibond 5-0; Ethikon GmbH, Norderstedt) rechts und links der zentralen Verbindungsschraube fixiert. Anschließend wurde mit einem Filzschreiber unter Anspannung der Haut die Stelle der Stichinzision markiert und danach durchstoßen. Die beiden Verbindungsschrauben konnten nun mit Minibulldogklemmen fixiert werden. Bei ausreichender Durchleuchtung wurde der Gefäßverlauf und das Beobachtungsfenster mit einem Filzschreiber angezeichnet. Mit zuvor sterilisiertem Mikrochirurgiebesteck konnte nun das kreisrunde Beobachtungsfenster der zugewandten Hautschicht ausgeschnitten werden. So wurde die intakte Schicht der gegenüber liegenden Seite mit ihren versorgenden Gefäßen sichtbar. Nun konnte die zweite Kammerhälfte, deren Fenster mit einem sterilen Deckglas (Durchmesser: 11,5 mm, Stärke: 1 mm, Edgar Hefele Medizintechnik, München) versehen war, aufgesetzt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich keine Lufteinschlüsse innerhalb der Kammer bildeten. Außerdem sollte beim Festziehen der Muttern der drei Verbindungsschrauben ein Abstand von mindestens 3 mm zwischen den beiden Kammerhälften gewährleistet werden, um eine Kompression der Haut zu verhindern. Im Anschluss wurden die Ränder durch beide Kammern zur Stabilisierung mit weiteren Einzelknopfnähten (Ethibond, 5-0, Fa. Ethikon, Norderstedt) versehen. Postoperativ waren keine Veränderungen der Fress- und Schlafgewohnheiten erkennbar.



Abbildung 5:

Rückenhautkammer

*durch das Beobachtungsfenster sieht man die Blutgefäße der Rückenhaut der Maus
der Rahmen ist mit 3 Schrauben an der Rückenhaut befestigt*

2.2.3 Blutentnahme

Zur Punktion der *Vena facialis* wurde das Tier unter guter Beleuchtung auf einer Heizplatte plaziert. Das Vorgehen erfolgte gemäß den Empfehlungen der „University of Minnesota“ (2009) in Narkose. Zunächst wurde die Nackenhaut des Tieres mit festem Griff angespannt, so dass die Augen leicht aus den Augenhöhlen hervortreten und der Mund geöffnet ist. Im Folgenden wurde mit der anderen Hand die Freckle ertastet. Dies ist ein dunkel gefärbter, haarloser Fleck auf der Haut der Maus, der häufig auch etwas erhaben ist. Er befindet sich in den meisten Fällen submandibulär. Ca. 2-3 mm darüber kann die *Vena facialis* lokalisiert werden. Die Vene wurde mit einem Skalpell punktiert und das austretende Blut in einem Pipetiergefäß aufgefangen. Zur Blutstillung wurde ein Tupfer aufgebracht. Das so gewonnene Blut wurde danach für 15 min bei 2000 G zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum bis zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert.

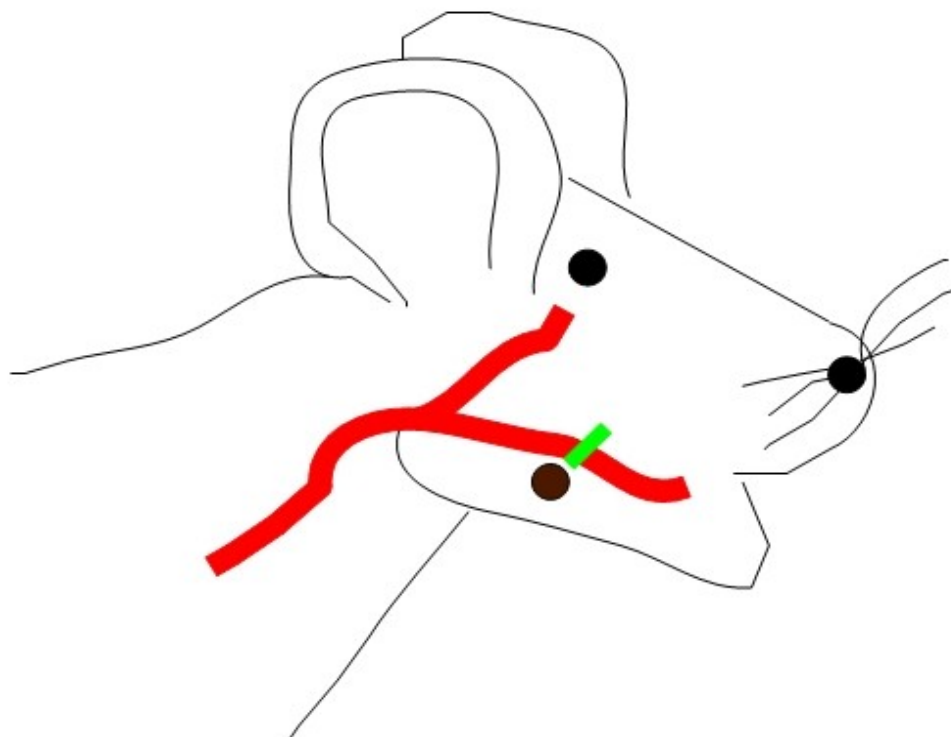


Abbildung 6:

Schematische Darstellung

die Blutentnahmestelle (grün) aus der Vena facialis befand sich ca. 2-3 mm über der haarlosen Freckle (braun)

2.2.4 Biomaterialimplantation

Zur Implantation des Biomaterials wurde unter sterilen Bedingungen das Deckglas am wachen Tier abgenommen und das Implantat atraumatisch auf die freie Rückenhautmuskulatur gebettet. Anschließend wurde das Beobachtungsfenster mit Deckglas und Sprengring wieder verschlossen.

2.2.5 Intravitalmikroskopie (IVM)

Die Angiogenese und die entzündlichen Reaktionen wurden über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Messzeitpunkte wurden jeweils an den Tagen 3, 7 und 14 nach Biomaterialimplantation durchgeführt. Dazu wurden 0,08-0,1 ml des FITC-Dextran intravenös appliziert. So konnte der Blutfluss in der Rückenhautkammer mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops dargestellt werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Belichtungszeiten der Rückenhautkammer nicht zu lange waren, um das Gewebe nicht zu schädigen (Steinbauer et al., 2000). Außerdem wurden noch 0,04-0,06 ml Rhodamin 6G appliziert. Mit Hilfe eines entsprechenden Filtersystems konnten die Leukozyten sichtbar gemacht werden. Die Plexiglasröhre mit dem darin fixierten Tier wurde nun auf einer Plexiglasbühne (Effenberger, München) befestigt. Diese konnte auf dem Mikroskoptisch so verschoben werden, dass durch das Mikroskop das gesamte Gewebe der Rückenhautkammer analysierbar war. Für die Untersuchungen wurde ein Leitz Orthoplan Stereomikroskop (Leitz, München) durch Epi-Illumination mit einer 100 W Quecksilber (XBO)-Lampe und einem Pleomopak-Illuminator System mit einem Leitz-Blaufilter (459-490 nm) eingesetzt. Mit einem Objektiv 20-facher Vergrößerung (Leitz GmbH, Wetzlar, Dt.) wurden nun je 3 *regions of interest* (ROI), die im Zentrum und in der Peripherie des Implantats lagen, jeweils 30 s mit einer Videokamera (C 2400-08; Hamamatsu, Herrsching) aufgezeichnet. Mit einem $\frac{3}{4}$ Zoll Videorecorder (Sony-Umatic, VO-5800-PS; Sony GmbH, München) wurden die IVM-Aufnahmen auf ein S-VHS Videoband aufgenommen.

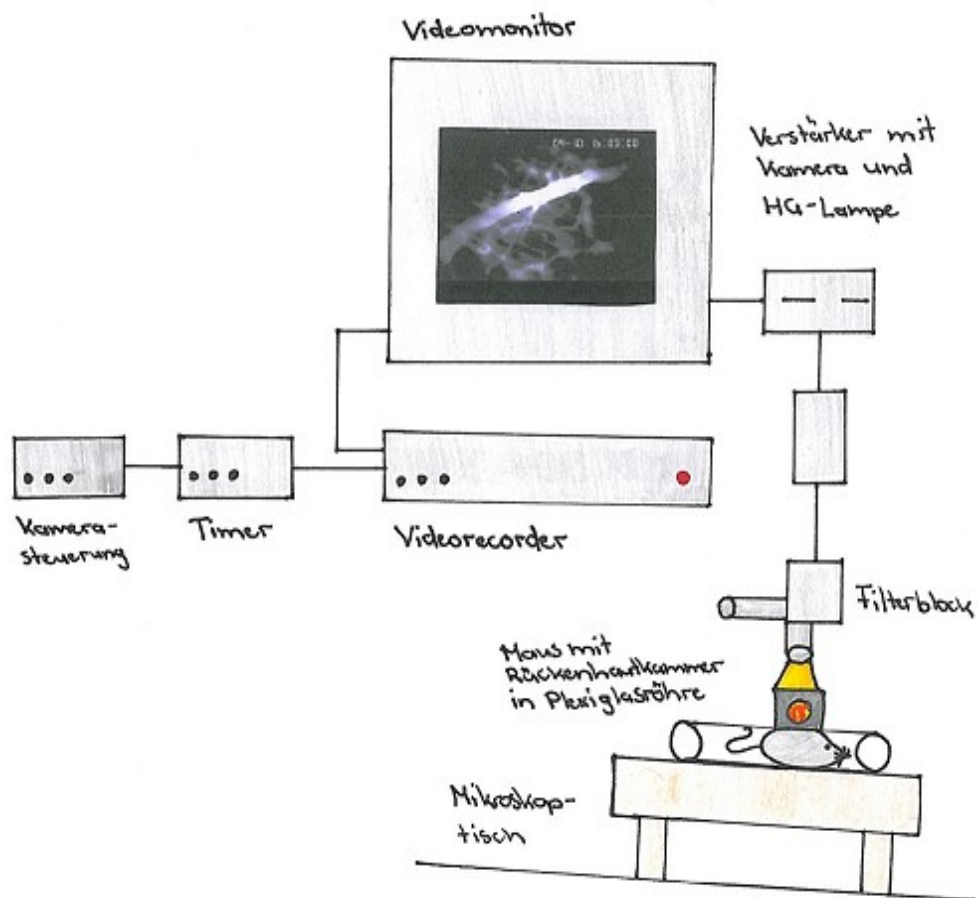


Abbildung 7:
Schematische Darstellung
Versuchsaufbau zur Intravitalmikroskopie

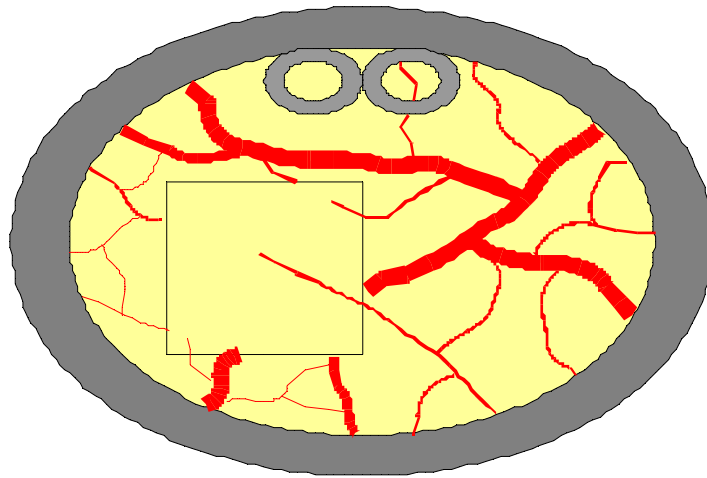


Abbildung 8:

Schematische Darstellung

Blick durch das Mikroskop auf die Rückenmarkskammer bei beginnender Angiogenese

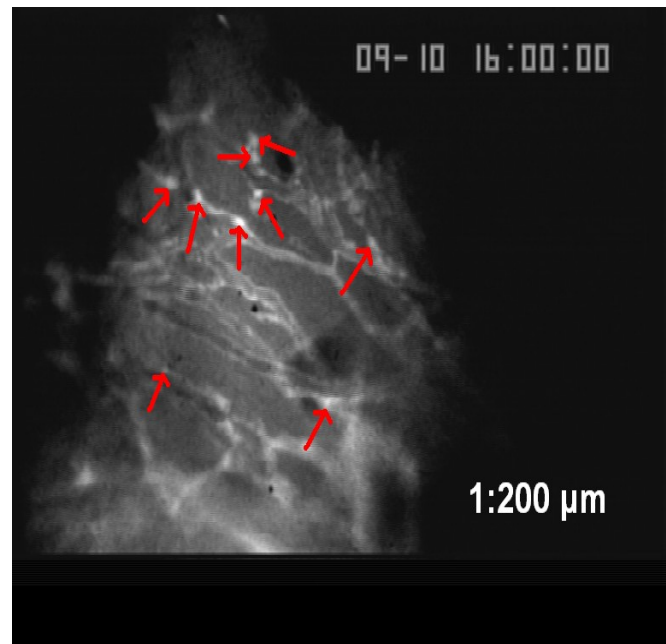
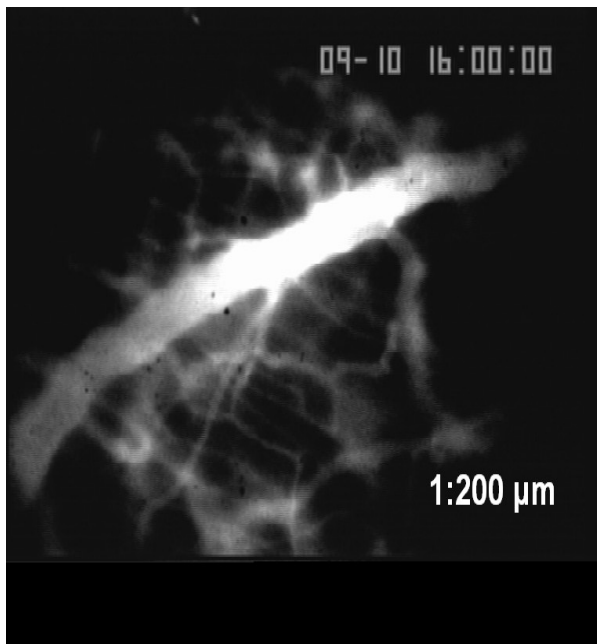


Abbildung 9: Darstellung des Blutplasmas mit FITC

Abbildung 10: Darstellung der Leukozyten mit R6G

2.2.6 Herzpunktion

Am Ende des Beobachtungszeitraumes wurde unter Vollnarkose eine Herzpunktion durchgeführt. Dazu wurde das Herz im Bereich des linken Brustkorbs ertastet und mit Hilfe eines Skalpells ein ca. 1 cm langer horizontaler Schnitt im 3. bzw. 4. Interkostalraum durchgeführt. Das so gewonnene Blut wurde mit einem Pipettiergefäß aufgefangen, 15 min bei 2000 g zentrifugiert und danach bis zur späteren Analyse im allergologischen Labor bei -20 °C eingefroren.

2.2.7 Messung der mechanischen Integration in vivo

Nach Entfernung der Rückenhautkammer wurde ein Seidenfaden durch die Perforation des Implantats gefädelt und die Federwaage in eine Fadenschleife eingehängt. Durch Höhenverstellung seiner Hebebühne konnte durch Distanzerhöhung die auf das Implantat wirkende Kraft gleichmäßig gesteigert werden. Über die Messung der Zeit bis zur Luxation des Biomaterials aus dem Implantatbett wurde die dynamische Desintegrationskraft errechnet (Formel nach Laschke et al.). Dieser Parameter ist ein Maß für die Verankerung der Polyethylenimplantate im Gewebe.

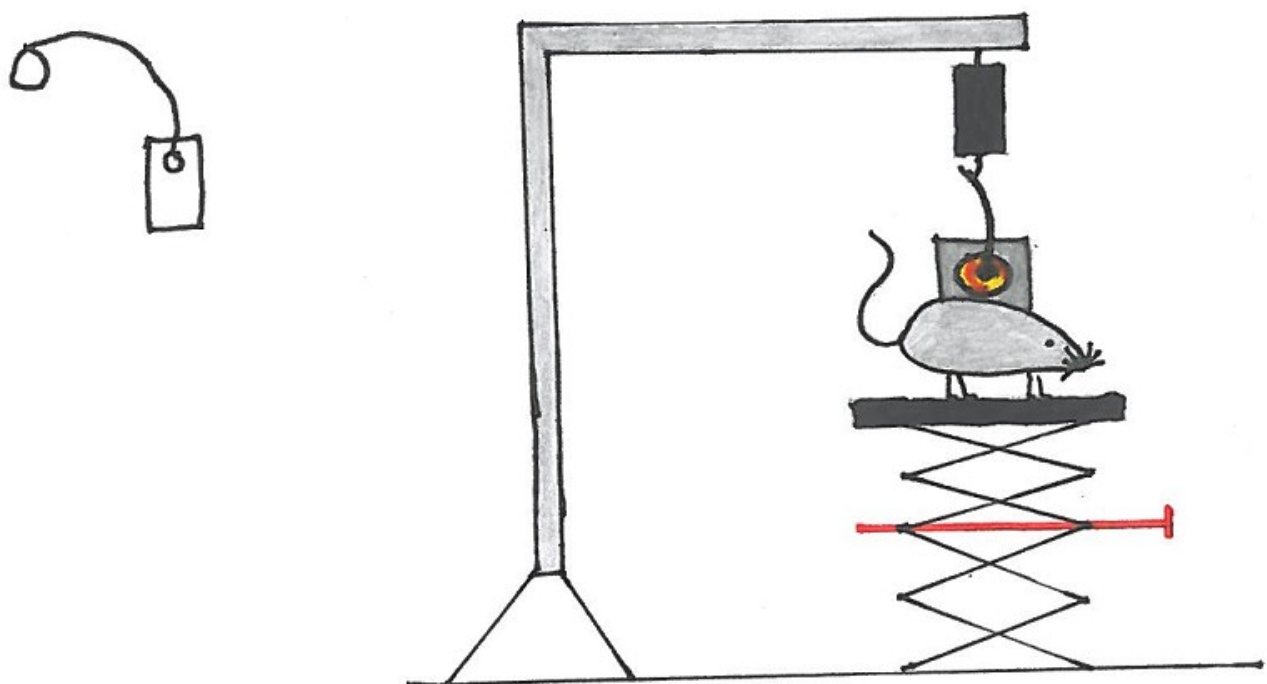


Abbildung 11:

links: gelochtes Implantat mit Fadenschleife

rechts: Aufhängung mit Federwaage und Versuchstier auf verstellbarem Modelltisch

2.2.8 Herstellung der Gewebeproben

50 % des entnommenen Implantatmaterials sowie je 2 Gewebeproben, die als Referenzproben dienten, wurden kryokonserviert für eine spätere Analyse der Entzündungsparameter. Die andere Hälfte des Implantatmaterials und ebenfalls je zwei Referenzproben wurden in later-RNA-kons-Lösung eingelegt.

2.2.9 IVM-Auswertung

Die Auswertung der Videoaufnahmen (Klyscz et al., 1997) wurde mit der Software Cap Image (Zeintl, Heidelberg) durchgeführt. Dazu wurde ein Personalcomputer mit Bildbearbeitungskarte (IP-8/AT, Matrox, Quebec, Kanada) verwendet, der über eine RS-232 Schnittstelle mit dem digitalen Videorekorder (Sony DVCAM DSV 45P; Sony Köln) verbunden war und außerdem an einen Videomonitor (PVM 1442 QM; Sony; Köln) angeschlossen war. Über den Gefäßdurchmesser (μm), die funktionelle Gefäßdichte (cm^{-1}) und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (mm/s) konnten Aussagen über die Mikrozirkulation getroffen werden. Im Anschluss daran konnte eine Aussage über den Entzündungsgrad getroffen werden, indem die Anzahl der adhärenen Leukozyten analysiert wurde.

Messung des Gefäßdurchmessers

Der Gefäßdurchmesser wurde gemessen, indem an drei verschiedenen Stellen eines Gefäßes eine Senkrechte zur Flussrichtung definiert wurde. Aus 3 Messungen wurde anschließend der Mittelwert errechnet.

Messung der funktionellen Gefäßdichte

Die funktionelle Gefäßdichte bezeichnet die Länge der Gefäße innerhalb eines Beobachtungsfeldes (cm/cm bzw. cm^{-1}). Dazu wurden alle sichtbaren Gefäße im Beobachtungsfeld ihres Verlaufs entsprechend markiert. Damit konnte die Gesamtlänge der Gefäße ermittelt werden (Klyscz et al., 1997).

Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{rbc}) wurde die "*line-shift-Methode*" verwendet. Dazu wurde eine Strecke innerhalb eines Gefäßes markiert und anschließend unter Verwendung von Grauwertunterschieden die Zeit gemessen, die die Erythrozyten für diese Strecke benötigen.

Messung des Leukozytenfluss

Der Leukozytenfluss wurde bestimmt, indem zunächst eine Linie senkrecht zu einem gewählten Gefäß festgelegt wurde. Anschließend wurde gezählt, wie viele Leukozyten diese Linie in einem Zeitraum von 30 s überqueren. Hieraus konnte die pro Sekunde passierende Anzahl Leukozyten bezogen auf einen Millimeter Gefäßstrecke errechnet werden.

Leukozytenadhärenz

Als adhärenente Leukozyten wurden diejenigen bezeichnet, die 30 s lang an einer markierten Stelle der Gefäßwand hafteten. Die Angabe erfolgte in Anzahl pro Quadratmillimeter Gefäßoberfläche.

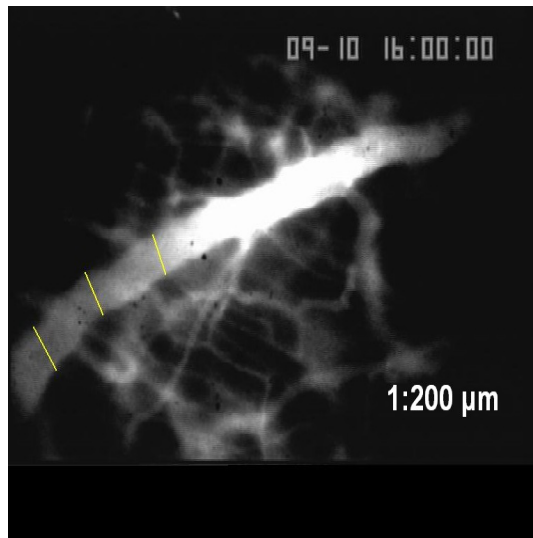


Abbildung 12: Messung des Gefäßdurchmessers

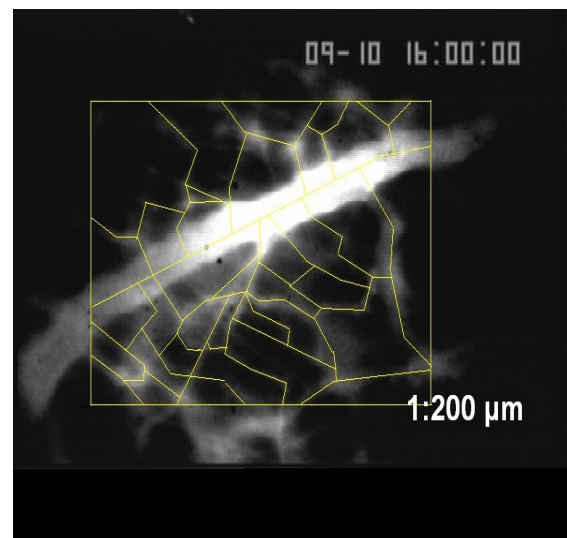
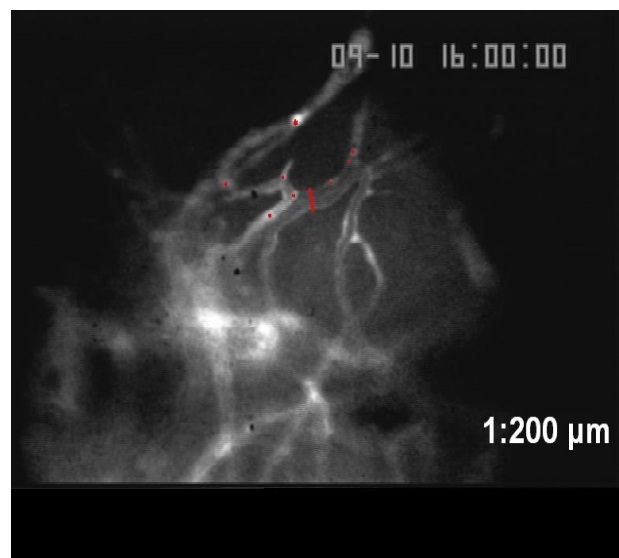
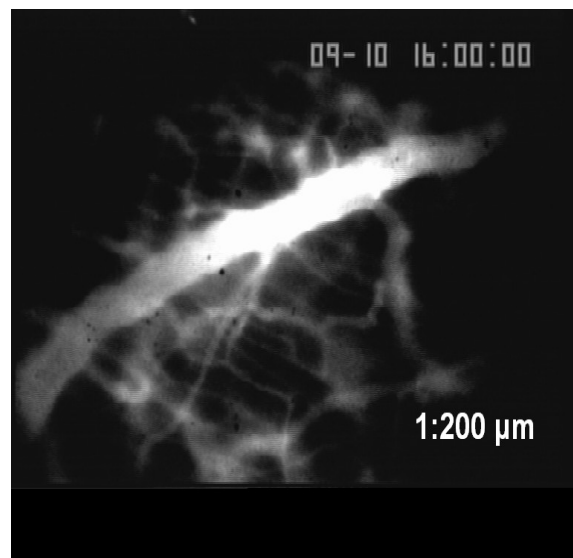


Abbildung 13: Messung der funktionellen Gefäßdichte

Abbildung 14: Messung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten

Abbildung 15: Messung des Leukozytenflusses und der adhärenen Leukozyten



2.2.10 Analyse der Serumproben

In Zusammenarbeit mit dem allergologischen Forschungslabor der dermatologischen Klinik der LMU wurde die Analyse der Serumproben mit Herrn Dr. B. Summer durchgeführt. Dazu wurde der *Master Buffer Kit* für Maus/Ratten- lösliche Proteine der Firma BD Biosciences USA verwendet. Die Proben wurden auf folgende Parameter untersucht: TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-17. Zunächst wurden alle gefriergetrockneten Standardsphären in ein 15 ml Falconröhrchen (Top-Standard) gegeben. Danach wurde 14 ml *Assay Diluent* dazugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden 64 FACS-Röhrchen für die vorhandenen 32 Serumproben vorbereitet, um jede Probe zweimal messen zu können. Zu jeder Serumprobe wurden im Anschluss daran 500 μ l *Assay Diluent* pipetiert. Außerdem wurden 10 FACS-Röhrchen für die Standardreihe vorbereitet. Im ersten FACS-Röhrchen befand sich 500 μ l *Assay Diluent*, das als 0 pg/ml Negativkontrolle diente. In FACS-Röhrchen 10 befand sich der Top Standard. Die Röhrchen zwei bis neun entstanden durch serielle Verdünnungen. Dazu wurden 500 μ l des Top Standards zum 1:2-Röhrchen, das bereits 500 μ l *Assay Diluent* enthielt, übertragen und dieses gründlich durchmischt. Aus diesem wurden anschließend 500 μ l entnommen und zum 1:4-Röhrchen übertragen. Diese Methode wurde bis zum 1:256-Röhrchen weitergeführt. Abschließend wurden die 10 Standardröhrchen in aufsteigender Konzentration aufgereiht. Nun konnten zunächst die zu untersuchenden Parameter der einzelnen Standards bestimmt werden, die anschließend als Kontrolle für die Serumproben dienten.

2.2.11 Analyse der Gewebeproben

RNA-Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurde der *High Pure RNA Isolation Kit* der Firma Roche (Basel) verwendet. Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert, in 200 µl PBS aufgenommen und in einem Homogenisator mit 400 µl Lyse-/Bindepuffer homogenisiert. Analog dazu wurden Zellen aus Kultur oder nach Ficoll-Dichtezentrifugation in 200 µl PBS aufgenommen und mit 400 µl Lyse-/Bindepuffer versetzt. Die Lösung wurde in die mit Glasvlies gepackte Säule gegeben und nach kurzer Zentrifugation (15 s) bei 10 000 rpm wurde der Durchlauf verworfen. Nun wurde für jede Probe 90 µl DNase Inkubationspuffer mit 10 µl DNase I gemischt und auf das Glasvlies pipetiert. Danach fand eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur statt. Im Anschluss daran erfolgten mehrere Waschschriffe: zuerst wurden 500 µl Waschpuffer I zugegeben und kurz zentrifugiert (15 s, 10 000 rpm). Dann wurden 500 µl Waschpuffer II zugegeben und wiederum zentrifugiert (15 s, 10 000 rpm). Abschließend wurden 200 µl Waschpuffer II zugegeben. Nach jeder Zentrifugation wurde der Durchlauf verworfen. Nun wurde die Probe für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert um Reste des Waschpuffers zu entfernen. Das Auffanggefäß wurde verworfen und die Säule in ein steriles 1,5 ml Tube gesetzt. Danach wurden 60 µl Elutionspuffer auf das Glasvlies pipettiert und die Probe 1 min bei 10 000 rpm abzentrifugiert. Die RNA-Lösung wurde sofort auf Eis gelegt und anschließend bei -80 °C gelagert.

Konzentrationsbestimmung der RNA

1 µl der RNA-Lösung wurde 1:20 in Aqua bidest verdünnt und in einem Photometer bei 260 nm (A260) gemessen. Zur Berechnung der Reinheit der RNA wurde die Probe bei 280 nm im Photometer gemessen (A280). Lag der Wert von $A_{260}/A_{280} > 1,8$ wurde die RNA für die weiteren Versuche verwendet, ansonsten weiter aufgereinigt.

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurde der *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* der Firma Roche verwendet. 2 µg Gesamt-RNA aus Gewebe bzw. die gesamte RNA aus den Zellkulturansätzen (ca. 0,5 µg) wurden jeweils umgeschrieben, indem die RNA in 12 µl RNase-freiem H₂O aufgenommen wurde und 1 µl Oligo(dT)18 Primer (2,5 µM) hinzugefügt

wurde. Das Gemisch wurde für 10 min bei 65 °C inkubiert und danach auf Eis gestellt. Hinzugefügt wurde: 4 µl Transkriptor RT Reaction Buffer (Endkonzentration 1x), 0,5 µl Protector RNase Inhibitor (20U), 2 µl Deoxynucleotide Mix (1 mM jedes) und 0,5 µl Transkriptor Reverse Transcriptase (10U). Das Gemisch wurde mit der Pipette gemischt und abzentrifugiert. Über 30 min bei 55 °C erfolgte anschließend die Reaktion. Danach wurde die Reverse Transkriptase durch einen Inkubationsschritt für 5 min bei 85 °C inaktiviert. Das Eppendorf-Gefäß mit der cDNA wurde danach bei -20 °C gelagert.

Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) konnten die DNA-Sequenzen im LightCycler quantifiziert werden.

Zunächst wurden die Proben in spezielle Glaskapillaren pipettiert. Diese haben einen Außendurchmesser von 1,55 mm und sind 35 mm lang. Das Reaktionsvolumen ist mit 10-20 µl sehr gering. Die raschen Temperaturänderungen im LightCycler werden durch die Verwendung von Luft zur Wärmeregulation sowie das optimale Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Kapillaren ermöglicht. Durch eine Lichtquelle in der PCR-Kammer werden die Proben mit einer Emissionswellenlänge von 470 nm angeregt. Für diese Arbeit wurde der *FastStart DNA Masterplus SYBR Green I* -Kit der Firma Roche verwendet. Der Kit beinhaltet eine speziell für den LightCycler geeignete FastStart Taq DNA-Polymerase sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Bei diesem Farbstoff erfolgt die Messung der Fluoreszenz bei 530 nm. Das Enzym wird durch einen Inkubationsschritt über 10 min bei 95 °C inkubiert (sog. „Hot start“-Technik), was die Sensitivität der PCR deutlich erhöht. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet spezifisch doppelsträngige DNA. Er bindet bei jedem Amplifikationsschritt an das PCR-Produkt, welches dann mittels Fluoreszenz detektiert und quantifiziert wird.

Quantifizierung der Produkte:

Über eine Verdünnungsreihe (z.B. 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) erstellt die LightCycler-Software eine Kalibrierungsgerade, die dazu dient, die Anzahl an Kopien des spezifischen Produktes zu ermitteln. Zusätzlich wird zu jeder Probe ein Referenzgen amplifiziert, ein sog. „housekeeping gene“, in diesem Fall beta-2-Mikroglobulin. Anschließend wird ein Verhältnis gebildet, z.B. die IFN gamma/beta-2-Mikroglobulin-Ratio. Dadurch wird ein quantitativer Vergleich der Proben untereinander ermöglicht und Unterschiede in der cDNA-Menge ausgeglichen.

Zu Beginn wurde mit einer Pipette ein Reaktions-Mix mit jeweils 14 µl Fast Start Taq Polymerase komplettiert. Im Anschluss wurde der PCR-Mix vorbereitet und folgende Komponenten zusammenpipettiert: 5 µl H₂O, 0,5 µl spezifischer Primer-Mix (10 pmol jeder Primer) und 2 µl Master-Mix (5x konzentriert). Die benötigten Kapillaren wurden in den vorgekühlten Zentrifugieradaptoren bereitgestellt und 7,5 µl des PCR-Mixes in jede Kapillare pipettiert. Danach wurden noch 2,5 µl der entsprechenden cDNA (1:10 verdünnt) hinzugefügt und die Kapillaren mit den passenden Verschlüssen abgedichtet. Nach Zentrifugation bei 2500 rpm für 15 sec wurden die Kapillaren in das Light Cycler-Karussell überführt und die PCR gestartet.

Letztendlich erfolgte die Analyse folgender DNA: GAPDH, IFN-γ, IL-1β, IL-6, IL-17A, IL-2, IL-4, IL-10P, MMP-9 und TNF-α.

2.2.12 Anfertigung der Statistik

Die Messdaten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler (MW +/- SEM) angegeben. Die Daten wurden nicht-parametrisch mit Hilfe eines Intergruppenvergleichs (Rangsummentest nach Mann.-Whitney) und eines Intragruppenvergleichs (*repeated measures analysis on ranks*) statistisch analysiert (Sigma Stat; Jandel Corp. San Rafael, USA). Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$.

2.2.13 Versuchsablauf

Zunächst wurden Rückenhautkammern chirurgisch implantiert. Zwei Tage später wurde jedem Tier durch Punktion der Vena facialis eine Blutprobe abgenommen, um nach Zentrifugation mindestens 50 µl Serum zu gewinnen. Die Serumproben wurden bis zur späteren Analyse bei -20 °C gelagert. Außerdem wurde die Biomaterialimplantation durchgeführt, wozu die Tiere randomisiert in drei Gruppen eingeteilt wurden. Dabei bekam die erste Gruppe Polyethylen implantiert, das zuvor mit in Matrigel® gelöstem Etanercept beschichtet worden war. Die zweite Gruppe erhielt Implantate, die nur mit Matrigel® versetzt worden waren. Die dritte Gruppe diente als Kontrollgruppe und wurde mit unbeschichtetem/nativem Polyethylen versehen. Drei Tage nach der Implantation wurden die ersten IVM-Aufnahmen durchgeführt, wozu FITC-Dextran und Rhodamin 6G intravenös über eine Schwanzvenenpunktion appliziert wurden. Am siebten Tag nach der Implantation wurden zur Verlaufskontrolle erneut IVM-Aufnahmen gemacht. Nach weiteren sieben Tagen wurde eine abschließende Untersuchung in den Rückenhautkammern durchgeführt. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere euthanasiert und Blut über eine Herzpunktion asserviert. Danach wurde mit Hilfe einer Federwaage und einer Fadenschleife die dynamische Desintegrationskraft zum Herausluxieren des Implantats aus dem Tierkadaver gemessen (Lehr et al., 1993).

Versuchsablauf:

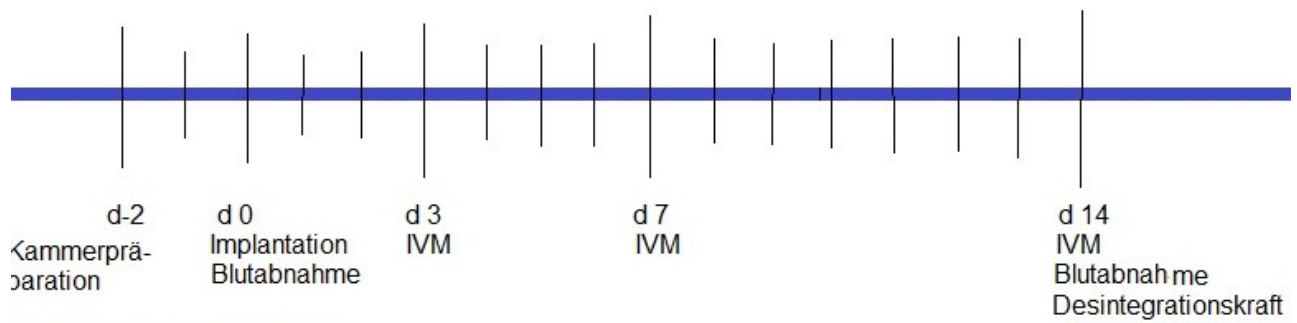


Abbildung 6: Versuchsablauf

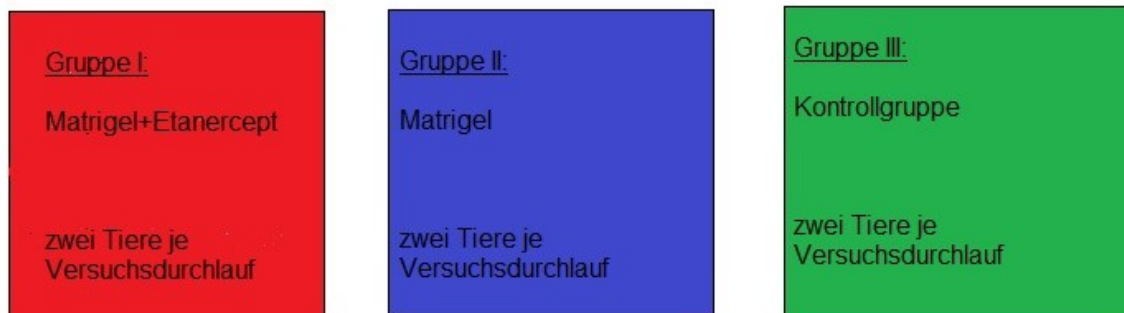


Abbildung 7: Aufteilung der Versuchstiere in drei Gruppen

3 Ergebnisse

3.1 Angiogenese und Analyse der mikrohämodynamischen Messwerte

Gefäßdurchmesser, die funktionelle Gefäßdichte und die Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurden in drei verschiedenen Regionen jeweils im Zentrum und in der Peripherie des Implantats beurteilt.

3.1.1 Gefäßdurchmesser

Die Durchmesser der funktionellen Blutgefäße wiesen bei den drei untersuchten Implantatgruppen an Tag 3 signifikante Unterschiede auf. Hierbei waren die Durchmesser bei Matrigel®-beschichteten Implantaten am größten. Etanercept-Beigabe führte im Gegensatz dazu zu signifikant kleineren Gefäßdurchmessern. An Tag 7 und 14 wurden allerdings keine signifikant unterschiedlichen Gefäßdurchmesser bei den angiogenetischen Gefäßen beobachtet.

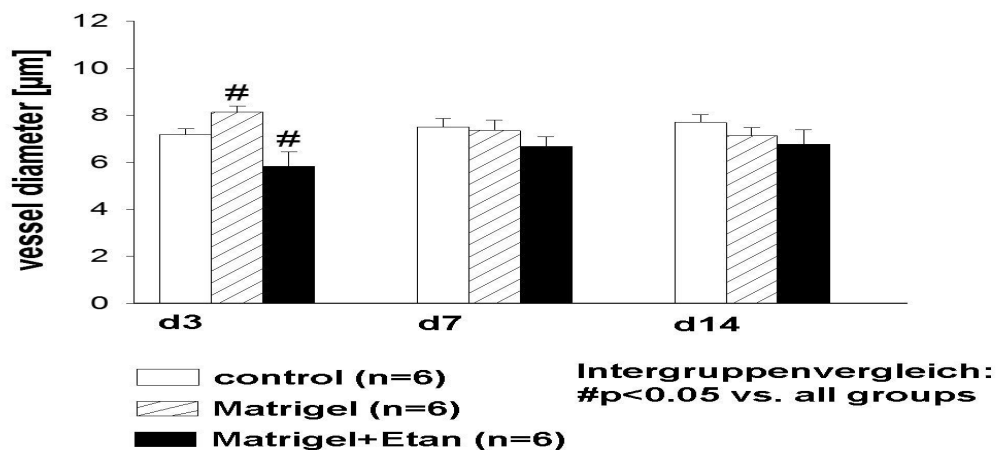


Abbildung 18:

Durchmesser der Blutgefäße

Es waren nur an Tag 3 vorübergehend signifikante Unterschiede feststellbar. Mit Matrigel®-Beschichtung waren die Gefäßdurchmesser am größten, mit Etanercept-Beigabe am kleinsten.

3.1.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Bei der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten unterschieden sich die einzelnen Gruppen an allen Messzeitpunkten nicht wesentlich voneinander.

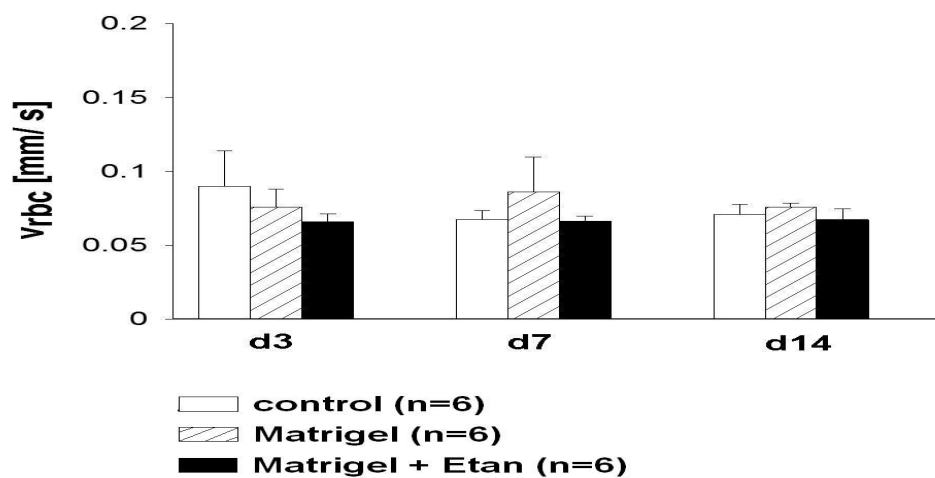


Abbildung 19:

Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen.

3.1.3 Funktionelle Gefäßdichte

Bei der funktionellen Gefäßdichte konnten an Tag 3 keine wesentlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. An Tag 7 war durch eine Beschichtung mit Matrigel oder mit Etanercept in Matrigel ein Anstieg der funktionellen Vaskularisation beobacht- und messbar. Bei der Kontrollgruppe betrug die funktionelle Gefäßdichte $39,0 \text{ cm}^{-1} \pm 2,5 \text{ cm}^{-1}$. Mit Matrigel-Beschichtung betrug die Gefäßdichte in den Biomaterialien $65,0 \text{ cm}^{-1} \pm 7,5 \text{ cm}^{-1}$ und mit Etanercept in Matrigel sogar $85,0 \text{ cm}^{-1} \pm 7,5 \text{ cm}^{-1}$. Die Unterschiede bei den beschichteten Implantaten waren im Vergleich zu den unbeschichteten Kontrollen statistisch signifikant. An Tag 14 waren die Unterschiede noch ausgeprägter. Während bei der Kontrollgruppe die funktionelle Gefäßdichte $40,0 \text{ cm}^{-1} \pm 2,5 \text{ cm}^{-1}$ betrug, betrug sie in der Matrigel-Gruppe $82,5 \text{ cm}^{-1} \pm 5,0 \text{ cm}^{-1}$ und in der Etanercept-Matrigel-Gruppe $115,0 \text{ cm}^{-1} \pm 12,5 \text{ cm}^{-1}$. Somit war insbesondere in der Etanercept-Matrigel-Gruppe über den Beobachtungszeitraum ein deutlicher Anstieg der funktionellen Gefäßdichte erkennbar, obwohl nur ein tendenzieller und nicht signifikanter Unterschied zur Matrigel-Vergleichsgruppe vorlag.

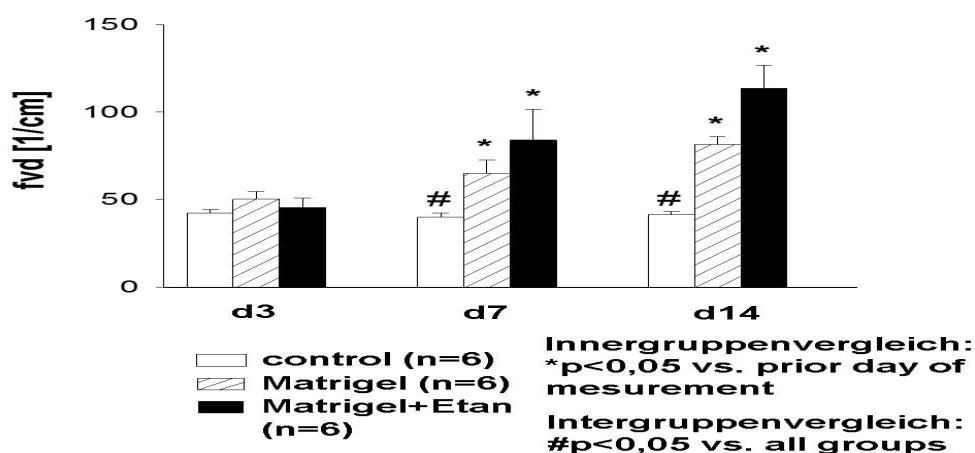


Abbildung 20:

funktionelle Gefäßdichte

Bei den Gruppen mit beschichteten Implantaten war ein signifikanter Anstieg der Gefäßdichte im Vergleich zu unbeschichteten Implantaten messbar. Tendenziell höher war die funktionelle Gefäßdichte nach TNF- α -Inhibition.

3.2 Leukozyten-Endothelzell-interaktionen

3.2.1 Leukozytenfluss

Die frei zirkulierenden Leukozyten bewegten sich zu allen drei Beobachtungszeitpunkten konstant in einem Rahmen von 1-1,5 s⁻¹.

Lediglich in der Matrigel-Gruppe kam es vorübergehend an Tag 7 zu erhöhten Werten. Es lagen ansonsten allerdings keine weiteren Zeichen einer systemischen Infektion vor.

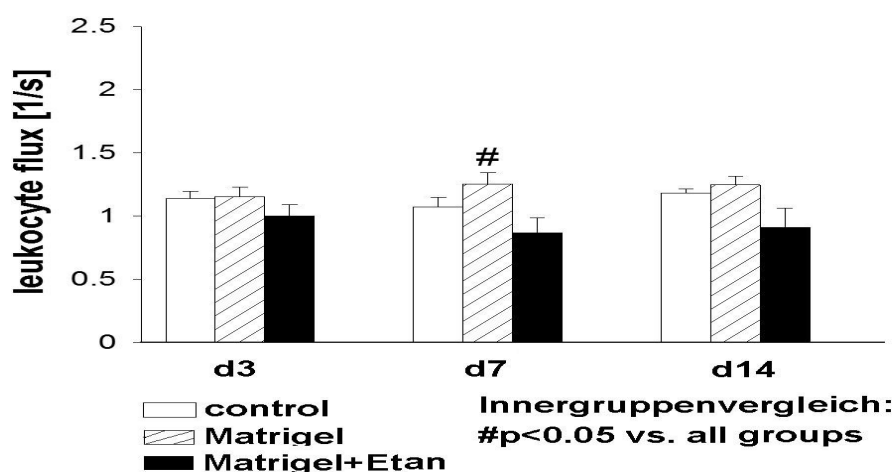


Abbildung 21:

Leukozytenfluss

Bei den frei zirkulierenden Leukozyten war vorübergehend an Tag 7 im Innergruppenvergleich ein erhöhter Wert bei der Gruppe mit Matrigel messbar.

3.2.2 Adhärenente Leukozyten

Bei der Messung der adhärenenten Leukozyten fiel bereits an Tag 3 ein deutlich reduzierter Wert der Etanercept-Matrigel®-Gruppe gegenüber den anderen beiden Gruppen auf.

Die Werte waren im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen um ungefähr die Hälfte reduziert. Im weiteren Beobachtungsverlauf ergab sich sogar noch eine Verstärkung des Effektes einer TNF- α -Inhibition (Etanercept-Gruppe). Insbesondere der Vergleich zur Matrigel®-Gruppe spricht für einen deutlichen und spezifischen antiinflammatorischen Effekt auf die Gefäßaktivierung durch Etanercept in den ersten 2 Wochen nach Implantation (Tag 14: 600 +/- 50 mm⁻¹). Die Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Adhärenz war erheblich und betrug nach 14 Tagen im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollen nahezu 70 %.

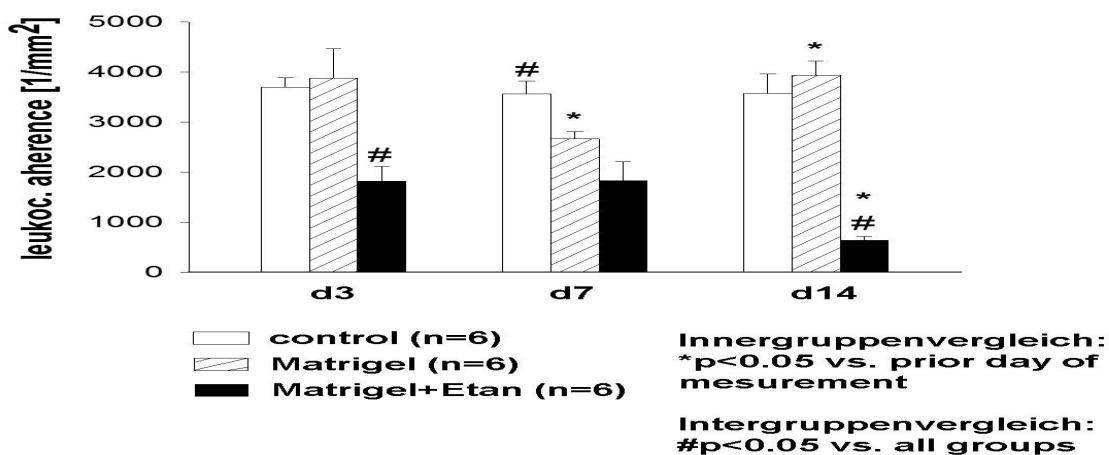


Abbildung 22:

adhärente Leukozyten

Bei der Etanercept-Matrigel-Gruppe waren signifikant geringere Werte zu messen im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen. Dies spricht für einen erheblichen antiinflammatorischen Effekt durch Etanercept in den ersten 2 Wochen nach Implantation (70% Inhibition im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollen).

3.3 Dynamische Desintegrationskraft

Bei der Messung der dynamischen Desintegrationskraft gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Kraft lag in allen Gruppen zwischen 0,7 und 1 cN/mm². Allerdings lagen tendenziell reduzierte Werte in der Etanercept-Matrigel-Gruppe vor, was für eine etwas bessere mechanische Integration in vivo spricht.

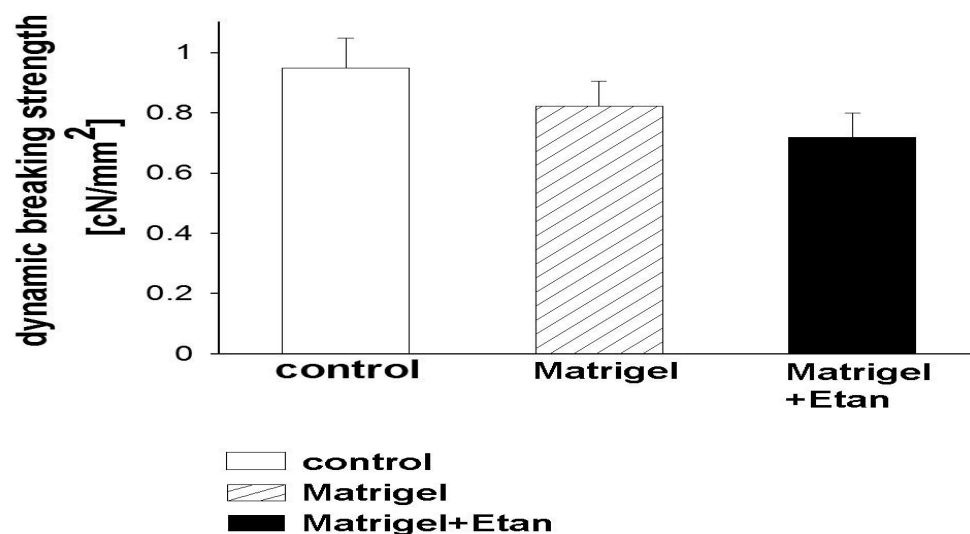


Abbildung 23:
dynamische Desintegrationskraft
Die dynamische Desintegrationskraft unterschied sich nicht signifikant bei den Vergleichsgruppen.

3.4 Analyse der Serumproben

Zur weiteren Charakterisierung der inflammatorischen Vorgänge in den Biomaterialgruppen wurden folgende Entzündungsparameter analysiert: TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8 und IL-17. Die in der Statistik verwendeten Werte sind dimensionslose Zahlen, die sich aus dem Verhältnis des jeweiligen Entzündungsparameters zum house-keeping-gene GAPDH ergeben. TNF- α , IL-4, IL-8 und IL-17 waren weder an Tag 0 noch an Tag 14 nachweisbar. INF- γ , IL-2 und IL-10 wiesen zu beiden Zeitpunkten einzelne stark erhöhte Werte auf, die allerdings stark schwankten. In allen drei Gruppen waren nur Werte für IL-1 β und IL-6 wiederholt nachweisbar. Bei IL-1 β waren bereits an Tag 0 Werte bis 22 messbar. An Tag 14 waren Werte bis 9 vorhanden. Bei IL-6 waren es an Tag 0 Werte zwischen 2 und 40. An Tag 14 waren Werte bis 37 messbar. Hieraus ergab sich, dass ausschließlich die Analysen von IL-1 β und IL-6 aussagekräftige und nachweisbare Werte lieferten. Die Serologie von IL-1 β und IL-6 wird in diesem Abschnitt graphisch dargestellt.

3.4.1 IL-1 β

Bei der Serologie von IL-1 β konnte festgestellt werden, dass der Messwert in der Kontrollgruppe stark abnahm. Er betrug an Tag 0 5,50 \pm 5,50 und an Tag 14 1,25 \pm 1,00. In der Matrigel-Gruppe nahm der Wert leicht zu. Er betrug hier an Tag 0 1,50 \pm 1,00 und an Tag 14 2,00 \pm 1,50. In der Gruppe mit Matrigel+Etanercept war nur an Tag 14 ein geringer Wert messbar.

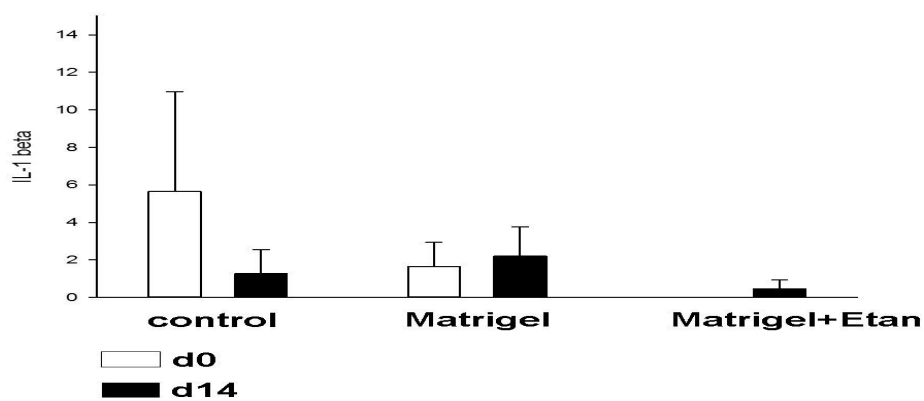


Abbildung 24:
Serologie von IL-1 β

3.4.2 IL-6

Interessanterweise war dieses Zytokin am Ende des Beobachtungszeitraumes ausschliesslich unter dem Einfluss von Etanercept signifikant reduziert.

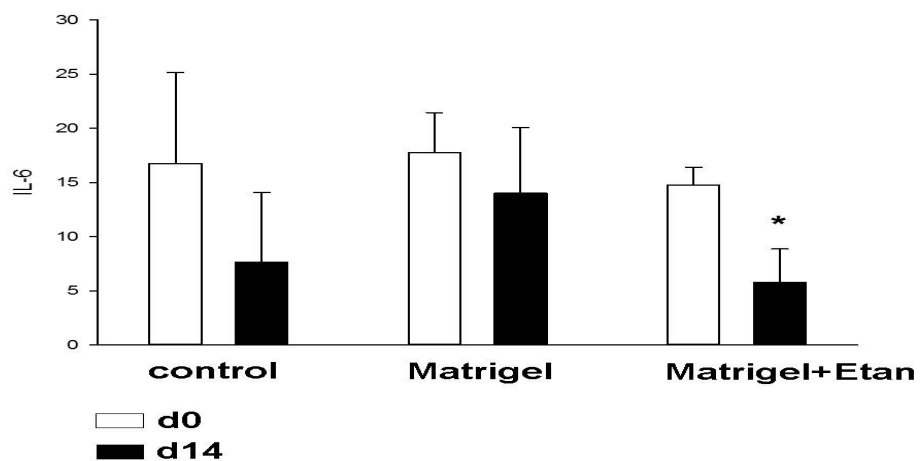


Abbildung 25:
Serologie von IL-6

3.5 Analyse der Gewebeproben

IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10P, IL-17A und MMP-9 waren im Implantatbett nicht nachweisbar.

3.5.1 mRNA IL-1 β

Vermehrt nachweisbar war im Implantatbett lediglich IL-1 β -RNA nur unter TNF- α -Inhibition, wobei dieser Effekt nicht statistisch signifikant war.

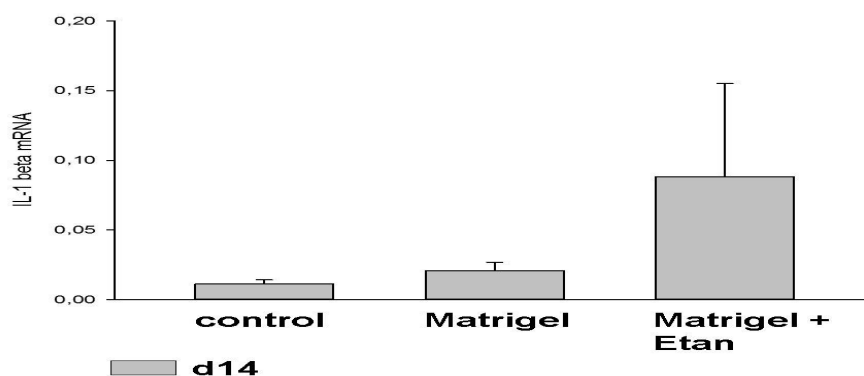


Abbildung 26:
IL-1 β mRNA

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Modell der transparenten Rückenhautkammer

Ziel der vorliegenden Studie war es zu untersuchen, ob sich durch TNF- α -Inhibition die perioperative Inflammation sowie die vaskuläre und mechanische Integration bei Biomaterialimplantation von porösem Polyethylen beeinflussen lässt. Dieses Biomaterial findet bereits seit einigen Jahren erfolgreich Verwendung in der rekonstruktiven Gesichtschirurgie (Wellisz et al., 1993; Stelter et al., 2007). Anderen Materialien wie Proplast und e-PTFE (Gore Tex, WL Gore & Associates, USA) ist es auf Grund seiner guten Verarbeitbarkeit und seiner Gewebeverträglichkeit überlegen (Berghaus et al., 2006).

Da für diese Studie ein Beobachtungszeitraum von 14 Tagen notwendig war, kamen bekannte Akutmodelle, wie das des M. cremaster (Baez, 1973, Vollmar et al., 2001b) oder des Dünndarms (Massberg et al., 1998, 1999) nicht in Frage. Diese Modelle können nur akute Veränderungen nach Applikation einer bestimmten Substanz zeigen. Vom Modell der transparenten Rückenhautkammer abgesehen, existieren auch weitere Modelle, die eine Beobachtung der Angiogenese über einen längeren Zeitraum ermöglichen. Dazu zählt der *chorioallantoic membrane assay* (CAM) am Hühnerembryo, bei dem durch ein Fenster in der Eierschale eine Testsubstanz auf die CAM aufgetragen wird. Jedoch treten hierbei häufig Entzündungen auf, da die Versuche zu einem relativ frühen Zeitpunkt der Embryonalentwicklung durchgeführt werden. Zudem ist das embryonale Immunsystem nicht mit dem adulten vergleichbar. Deswegen gibt es häufig spezifische Probleme, wenn Zielparameter der Inflammation im Zentrum des Interesses stehen. Außerdem sind Gefäße unter 10 μm schwer erkennbar (Laschke et al., 2006). Die Applikation von Fluoreszenzmarkern zur Darstellung der Gefäße ist technisch kaum durchführbar, was die Beobachtung kleinster Gefäßneubildungen nahezu unmöglich macht. Auch an den

Embryonen von Zebrafischen kann auf Grund ihrer Transparenz die Angiogenese direkt beobachtet werden (Lawson et al., 2002) oder fluoreszierende Tumorzellen (Haldi et al. 2006; Stoletov et al., 2007) können injiziert werden, die anschließend unter dem Mikroskop sichtbar werden. Weitere Versuche zur Angiogenese mit Tumorgewebe wurden an der Cornea des Kaninchens gemacht. Diese stellt das einzige avaskuläre transparente Gewebe des Körpers dar, so dass jedes neu gebildete eindringende Gefäß sofort erkennbar ist. Jedoch ist diese Methode als teuer, zeitraubend und technisch schwierig einzustufen (Gimbrone et al., 1974; Auerbach et al., 1979).

Das Modell der transparenten Rückenhautkammer ist ein seit Jahren etabliertes Modell, das erfolgreich an Mäusen (Algire, 1943), Hamstern (Endrich et al., 1980), Ratten (Papenfuss et al., 1979) und am Kaninchenohr (Sandison 1924) angewendet wird. Es erlaubt die Beobachtung der Angiogenese am selben Tier über einen Zeitraum von 3-4 Wochen. Zudem ist dazu keine langanhaltende Anästhesie erforderlich (Messmer et al., 1998). Die Nebenwirkungen einer Anästhesie auf die Mikrozirkulation sind bereits bekannt (Colantuoni et al., 1984). Die Präparation der Kammer führt zu keiner Granulationsgewebebildung (Menger et al., 1993). Bereits nach einem Erholungszeitraum von 48 h gibt es keine operationsbedingten vaskulären Veränderungen mehr. Neben porösem Polyethylen (Strieth et al., 2010) können auch Tumorzellen (Eichhorn et al., 2007), Ovarialfollikel (Vollmar et al., 2001) und Nebenschilddrüsengewebe (Strieth et al., 2005) implantiert werden.

Insofern erschien das gewählte Modell den vielversprechendsten Ansatz zur Beantwortung der Fragestellung der vorliegenden Untersuchung darzustellen.

4.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Implantatgruppen in Bezug auf Angiogenese und Entzündungsantwort feststellen zu können, wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Mit Hilfe von fluoreszierenden Markern (z.B. FITC oder Rhodamin 6G) konnten hiermit Mikrozirkulation bzw. Leukozyten in vivo visualisiert werden und Parameter wie Gefäßdurchmesser, Gefäßdichte, Erythrozytenfließgeschwindigkeit bzw. Leukozytenzahl und Leukozytenadhärenz gemes-

sen werden.

Andere Methoden zur Beobachtung der Mikrozirkulation wie die Laser-Doppler-Flussmessung, histologische Methoden oder die ^{133}Xe -Auswaschung sind methodisch unterlegen, da kein Verfahren vergleichbar valide Messungen sämtlicher Parameter ermöglicht (Laschke et al., 2006). Auch anderen klinisch verwendeten bildgebenden Verfahren wie Positronen-Emissions-Tomographie, Computertomographie und Kernspintomographie ist es auf Grund seiner besseren Auflösung überlegen, da mit der IVM Gewebe in der Größenordnung von 1-10 μm exakt abgebildet werden können (Fukumura et al., 2010).

Ansätze zu Versuchen mit der IVM gab es bereits im 19. Jahrhundert (z.B. Wagner, 1839). Mitte der 50er Jahre fanden Versuche an der Hasenohrkammer statt (Wood, 1958). Aber erst in den 90er Jahren gab es den Durchbruch mit der Verbesserung der intravitalen Bildgebung (Beerling et al., 2011). Durch die bis zu tausendfache Vergrößerung bei Untersuchungen und die Verwendung von digitaler Bildanalyse (Vajkoczy et al., 2000) ist eine optimale Auswertung gewährleistet. Seitdem stellt es ein wichtiges Mittel in der Tumorforschung dar (Chishima et al., 1997).

Jedoch bringt der Einsatz des IVM auch spezifische Limitationen mit sich. Eine zu lange andauernde Belichtungszeit kann auch bei ausreichend Abstand zwischen Fokus und Objekt eine phototoxische Reaktion hervorrufen (Harris et al., 2002). Außerdem können Hintergrundfluoreszenzen auftreten, wenn zu viel Fluoreszenzmarker verwendet wird (Lehr et al., 1993). Dies kann dazu führen, dass die Blutgefäße, auf Grund von mangelndem hell-dunkel-Kontrast nicht mehr identifizierbar sind und somit eine Analyse unmöglich wird.

Der Einsatz von fluoreszierenden Plasma- und Zellmarkern ermöglichte die Darstellung sogar von Kapillaren mit Durchmessern von unter 10 μm (Laschke et al., 2006). Um phototoxische Reaktionen zu vermeiden, wurde für jeden Fluoreszenzfarbstoff ein Filter im dafür vorgesehenen Wellenlängenbereich (FITC: 450-490 nm, Rhodamin 6G: 510-560 nm) eingesetzt. Das Ausmaß phototoxischer Effekte hängt entscheidend von der Lichtintensität und Bestrahlungsdauer ab (Steinbauer, Harris et al., 2000). Bei einer Bestrahlungsdauer von 60 min. wurden Folgen wie Thrombozytenaktivierung, Thromboseneigung, Endothelzellschädigungen oder Vasospasmen bei Arteriolen beschrieben (Saetzler, Jallo et al., 1997; Harris et al., 2000). Eine leicht erhöhte Zahl rollender Leukozyten wurde bei 4 x 30 s Bestrahlung mit hohen Lichtintensitäten beobach-

tet. Die Belichtungszeit konnte minimiert werden, indem die IVM-Bilder mit einem Videogerät aufgezeichnet wurden, das mit der Mikroskopeinheit verbunden war. So konnten die Bilder zu einem späteren Zeitpunkt off-line ausgewertet werden.

Zur Vermeidung von Hintergrundfluoreszenzen wurde auf die exakte Einhaltung der Mengenangabe geachtet, die sich bereits in vorausgegangenen Studien bewährt hatte (0,05 ml für FITC, 0,04 ml für Rhodamin 6G).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Untersuchung der Angiogenese

Bei der Integration eines Implantats spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle.

Eine zu langsame Etablierung der Mikrozirkulation ist als ein wesentliches Problem bei der Integration von Biomaterialien bekannt (Laschke, Harder et al., 2006). Je schneller Blutgefäße in das Implantat einwachsen, desto besser ist möglicherweise dessen mechanische Gewebeintegration.

Deshalb beschäftigten sich bereits mehrere Autoren mit der Frage wie man die Angiogenese bei Biomaterialimplantaten verbessern könnte (Laschke et al, 2008; Strieth et. al., 2010; Ehrmanntaut et. al., 2012; Hussain et. al., 2013). Dazu wurden zum Beispiel Wachstumsfaktoren verwendet, die systemisch, lokal oder mit Gentransfer appliziert wurden (Strieth et. al., 2010). Diese werden unter physiologischen Bedingungen vornehmlich von Fibroblasten produziert (Martin et. al., 1999). Deren proangiogenetische Aktivität ist bereits in vitro häufig nachgewiesen worden (Newman et. al., 2011). Dazu zählt die Produktion proangiogenetischer Faktoren (Hurley, Blaji et al., 2010) und Effekte auf die Ausbildung von Kapillarnetzwerken. Der wichtigste von Fibroblasten produzierte angiogenesestimulierende Faktor ist *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Ferrara et. al., 1993). Zudem wurden kombinierte Implantatkonstrukte mit Endothelzellen, Stammzellen oder arteriovenösen Shunts untersucht (Laschke et al., 2006). Der Arbeitsgruppe um Laschke gelang in Mainz auch eine beschleunigte Vaskularisierung von PLGA-Implantaten, indem er diese mit extrazellulären Matrixkomponenten beschichtete (BD Matrigel, Matrix Growth Factor Reduced, BD Biosciences, Heidelberg). In einer weite-

ren Studie stellte er überdies fest, dass GFCM (Ferrara et. al., 1993) die Angiogenese gegenüber GFRM verbesserte (Laschke et al., 2008).

Speziell bei porösem Polyethylen gab es auch bereits konkrete Ansätze zur Beschleunigung der Angiogenese. So wurde in einer Studie poröses Polyethylen mit Chondrozyten beschichtet, was die Vaskularisierung und die Inkorporation des Implantats beschleunigte (Ehrmanntraut et al., 2012). In einer anderen Studie aus der eigenen Arbeitsgruppe wurden Implantate aus porösem Polyethylen, die mit Matrigel® allein einerseits und andererseits mit Matrigel und VEGF beschichtet waren, miteinander verglichen (Strieth et al., 2010). Es konnte hierbei allerdings keine quantitativ bessere Vaskularisierung oder eine Beschleunigung der Angiogenese beobachtet werden.

Wie bereits bekannt ist, spielt auch das Porenvolumen der Implantate eine entscheidende Rolle bei der Vaskularisierung (Chiu et al., 2011). Laschke et al. verwendete PLGA mit einem Porenvolumen von 380 μm . Er verbesserte dessen Vaskularisierung indem er eine Beschichtung mit GFCM verwendete. Strieth et al., der unterschiedlich beschichtete Implantate miteinander verglich, arbeitete mit porösem Polyethylen mit einem Porenvolumen von 100-200 μm .

In der vorliegenden Studie wurde wiederum poröses Polyethylen mit einer Porengröße von 100-200 μm verwendet. Als Angiogeneseparameter dienten: Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit und funktionelle Gefäßdichte. Beim Gefäßdurchmesser gab es keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Gruppen oder den einzelnen Beobachtungszeitpunkten. Bei der Erythrozytenfließgeschwindigkeit waren ebenfalls keine signifikanten Veränderungen feststellbar. Bei der funktionellen Gefäßdichte war jedoch ein deutlicher Anstieg besonders bei Implantaten, die mit Matrigel und Etanercept beschichtet waren, erkennbar. Dies spricht für einen proangiogenetischen Effekt durch TNF- α -Inhibition.

Matrigel® Effekte sind bereits vielfältig beschrieben (Arnaoutova et al., 2009). Interessant ist der Effekt von Etanercept auf die mikrovaskuläre Implantatintegration, wozu bisher kaum Daten vorliegen. Es konnten aber spezifische Effekte auf die Mikrozirkulation des Innenohres beschrieben werden (Scherer et al., 2010).

4.2.2 Entzündungsantwort

Die Entzündungsantwort ist ein weiterer wichtiger Parameter, wenn es um die Beurteilung der Verträglichkeit eines neuen Implantats geht. Das Auftreten einer Entzündung gilt neben den Komplikationen bei der vaskulären Integration als häufigste Ursache für die Abstossung eines Biomaterials (Berghaus et al., 1984, 1985). Die Entzündungs- und Abstoßungsreaktion, die beim Implantieren von Fremdmaterial auftreten kann, ist wesentlich auch eine allergische Reaktion vom verzögerten Typ (Typ IV-Reaktion nach Coombs und Gell). Die Messwerte sollten daher erst nach 24-48 Stunden (Gell et al., 1963) bestimmt werden. Deswegen war für diese Versuchsreihe zur Beurteilung der Entzündungsantwort ein entsprechend langer Beobachtungszeitraum von bis zu 14 Tagen gewählt worden.

Viele Autoren beschäftigten sich bereits mit dem Entzündungsgeschehen nach Implantation von Fremdmaterial mit vergleichbaren experimentellen Ansätzen. So implantierte Rücker 2006 PLGA-Implantate in die Rückenhautkammer von Mäusen (Rücker et al., 2006). Er konnte beobachten, dass PLGA nur einen leichten Anstieg an Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen hervorrief. Auch die Biokompatibilität von Polyurethan wurde in vergleichbarer Weise untersucht, indem die rollenden und adhärenen Leukozyten in Rückenhautkammern von Mäusen über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet und gezählt wurden (Laschke et al., 2009). Es konnte so gezeigt werden, dass Polyurethan keine starke Entzündungsreaktion hervorruft.

Lee berichtete von einer Infektionsrate von nur 1,8 % bei der Verwendung von porösem Polyethylen zur Orbitarekonstruktion (Lee et al., 2010). In weiteren klinischen Studien wird poröses Polyethylen als sicheres und verlässliches Material zur Verwendung in der rekonstruktiven Chirurgie bezeichnet (Sdafani et al., 1997, Berghaus et al., 1985). Jedoch gibt es auch klinische Studien, die bei der Verwendung von porösem Polyethylen in der kraniofazialen Chirurgie von erheblichen Fremdkörperreaktionen berichten (Gosau et al., 2006). So konnten Entzündungsreaktionen mit Fremdkörperriesenzellen und Resorptionszonen beobachtet werden. Yaremchuk hingegen konnte in einer umfangreichen klinischen Studie die gute Biokompatibilität von porösem Polyethylen bei der Rekonstruktion des knöchernen Gesichtsschädels klinisch belegen. Von insgesamt 370 porösen Polyethylen-Implantaten mussten nur 10 % operativ revidiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden die intravitalen Messungen an Tag 3, 7 und 14 nach Implantation des porösen Polyethylens in die Rückenhautkammer vorgenommen. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie war es über einen längeren Zeitraum möglich, Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festzustellen. Es wurden an drei verschiedenen Zeitpunkten (Tag 3, 7 und 14) die rollenden und adhärenenten Leukozyten jeder Versuchsgruppe analysiert und miteinander verglichen. Dabei konnte beobachtet werden, dass es signifikant weniger adhärenente Leukozyten in der Etanercept-Matrigel-Gruppe gab im Vergleich mit den beiden Kontrollgruppen.

Die Reduktion der Leukozyten-Endothelzell-Adhärenz betrug nach 14 Tagen im Vergleich zu unbeschichteten Kontrollen nahezu 70 %.

Dieses Ergebnis belegt einen erheblichen und hoch signifikanten antiinflammatorischen Effekt einer TNF- α -Inhibition bei Biomaterialimplantation in vivo. Somit könnte auch klinisch die Bioverträglichkeit von porösem Polyethylen erheblich verbessert werden. Bei der Matrigel-Gruppe verändern sich die Entzündungsparameter über den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen im Gegensatz dazu nicht signifikant. Eine Modulation der Entzündungsreaktion durch Matrigel allein wurde dementsprechend hier nicht beobachtet. Dieses Ergebnis zeigt, dass unabhängig von einer VEGF-Beschichtung von porösem Polyethylen (Strieth et al., 2010) auch eine TNF- α -Inhibition zu einer deutlich geringeren Endothelaktivierung im Implantatbett führt.

In der hier vorliegenden Untersuchung untermauerten weitere Analysen der Serum- und Gewebeproben die antiinflammatorischen Effekte. Die Serumproben der Etanercept-Matrigel-Gruppe wiesen im Vergleich zu den anderen Gruppen besonders niedrige systemische Werte für IL-1 β und für IL-6 auf. IL-1 β gilt als zentraler Botenstoff bei der Antwort des Gastorganismus auf Fremdkörpereinflüsse. IL-6 ist der Aktivator der Akute-Phase-Proteine und stimuliert Leukozyten. Somit ergab sich sogar systemisch Anhalt für eine Reduktion der Inflammation durch Etanercept. Im Gegensatz dazu war allerdings an Tag 14 in der Etanercept-Matrigel-Gruppe auch eine erhöhte IL-1 β -mRNA-Expression erkennbar. Anhand der vorliegenden Daten kann die Interaktion bei der Regulation der Entzündungsreaktion nicht vollständig belegt werden.

In dieser Studie konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass eine Beschichtung von Implantaten aus porösem Polyethylen mit Etanercept und damit eine TNF- α -Inhibition zu

einer Reduktion der Inflammation führt. Zahlreiche weitere experimentelle Studien untersuchen derzeit Einsatzmöglichkeiten der entzündungshemmenden Wirkung von Etanercept:

In einer derartigen Studie wurde Etanercept erfolgreich zur Behandlung des Glaukoms bei Ratten (Roh et al., 2012) oder von Rückenmarksentzündungen bei Ratten eingesetzt (Genovese et al., 2005). Etanercept wurde bisher in Tierversuchen auch zur Behandlung von experimenteller Arthritis verwendet: Etanercept-behandelte Mäuse wiesen danach weniger CD 45-positive Zellen auf, die das Ausmass der Entzündung anzeigten (Misharin et al., 2012). Etanercept verminderte im Tiermodell die TNF- α -abhängige periphere und zentrale Entzündung, die zum Fortschreiten von experimentellen Lebererkrankungen führt (Chastre et al., 2012). Außerdem ist Etanercept im Zusammenhang mit Parodontitis an Ratten untersucht worden. Dazu wurde zunächst eine Parodontitis mit Hilfe einer Ligatur an Rattenmolaren induziert. Durch die Behandlung mit Etanercept konnte die Entwicklung einer parodontitis-assoziierten Entzündung reduziert werden. Die dabei freigesetzten Mediatoren konnten spezifisch mit Etanercept geblockt werden (Di Paola et al., 2007). Des Weiteren wurde Etanercept bereits am Menschen bei neurologischen Schädigungen eingesetzt. Die durch eine traumatische Hirnhautentzündung verursachte Überproduktion von TNF- α in den Mikroglia und die damit zusammenhängenden neurologischen Defizite konnten durch die posttraumatische Gabe von Etanercept verringert werden (Chung-Ching et al., 2013). Auch eine Verbindung zwischen Etanercept und systemischem Lupus erythematosus ist bekannt. Etanercept reduzierte im Rahmen einer klinischen Studie den mittleren arteriellen Blutdruck, der bei einem systemischen Lupus erythematosus chronisch erhöht ist (Venegas et al., 2010). Hieraus wird ersichtlich, dass Etanercept in Zukunft klinisch vielfältig zur Entzündungshemmung eingesetzt werden könnte. Auch die vorliegende Studie ist ein Beispiel für eine mögliche Anwendung von Etanercept. Sie zeigt, dass Etanercept bei der Implantation von porösem Polyethylen die Entzündung reduzieren kann.

4.2.3 Dynamische Desintegrationskraft

Obwohl Etanercept die inflammatorische Reaktion im Implantatbett reduzierte, war nicht klar, ob es dadurch auch funktionell zu einer besseren mechanischen Integration in vivo kam. Nur sehr wenige Studien analysieren tatsächlich die mechanische Integration der Implantate (Laschke, Haufel et al., 2003; Menger, Hammersen et al., 1992). In unserer Arbeitsgruppe ist der von Laschke beschriebene Versuchsaufbau etabliert, um damit erfolgreich den Effekt einer Beschichtung mit Extrazellulärmatrix und VEGF (Strieth et al., 2010) und mit Fibroblasten (Hussain et al., 2013) auf die dynamische Desintegrationskraft untersuchen zu können. In beiden Fällen waren keine signifikanten Veränderungen feststellbar. In der vorliegenden Studie wurde in Analogie untersucht, ob die biomechanische Implantatintegration nach 14 Tagen durch TNF- α -Inhibition verbessert werden kann. Dabei waren allerdings wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Implantatgruppen erkennbar. Nichtsdestotrotz zeigte sich eine tendenzielle Verbesserung. Es ist denkbar, dass die Unterschiede erst zu einem späteren Zeitpunkt – jenseits der 2 Wochen – statistische Signifikanz erreicht hätten. Dies soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden, wobei Langzeiteffekte im Tiermodell mit subkutanen Implantaten analysiert werden sollen.

4.2.4 Ausblick

Aufgrund der vielversprechenden Beobachtungen in unserer tierexperimentellen Studie, sowie aufgrund des bekannten günstigen Toxizitätsprofils am Menschen erscheint eine zeitnahe Testung der Etanercept-beschichteten porösen Polyethylen-Implantate in ersten klinischen Prüfungen aussichtsreich und realistisch.

5 Textzusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es heraus zu finden, ob eine TNF- α -Inhibition zu einer Verbesserung der Biomaterialintegration von Etanercept-beschichteten porösen Polyethylen-Implantaten führt.

Dazu wurden, bei der ersten Versuchsgruppe (n=6), Implantate aus porösem Polyethylen (4 mm x 4 mm x 0,1 mm) mit Etanercept in einer Trägersubstanz aus Extrazellulärmatrix (Matrigel) beschichtet und in Rückenhautkammern bei C57/Bl6 Mäusen implantiert. Kontrollgruppen erhielten unbeschichtetes - „leeres“ - poröses Polyethylen oder Matrigel®-beschichtete Implantate aus demselben Biomaterial. Im Anschluß daran wurden die Tiere über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet und dabei wiederholt intravitalmikroskopische Untersuchungen (Tag 3, 7 und 14) und Blutuntersuchungen (Tag 0 und 14) vorgenommen. Durch digitale Bildanalyse konnten Gefäßdurchmesser, Erythrozytenfließgeschwindigkeit, funktionelle Gefäßdichte sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in vivo quantifiziert werden. Außerdem wurden eine Reihe entzündlicher Zytokine im Serum und im Implantatbett analysiert. Schließlich wurde an Tag 14 die dynamische Desintegrationskraft gemessen.

Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass Etanercept zu einer Verbesserung der mikrovaskulären Implantatintegration mit erhöhten funktionellen Gefäßdichten führt. Es kam zu einer erheblichen und hoch signifikanten Reduktion der lokalen inflammatorischen Gewebereaktion in Form von deutlich reduzierter Leukozyten-Endothelzell-Adhärenz.

Diese Beobachtungen wurden auch von einer systemisch messbaren Reduktion einzelner proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-1 β) begleitet.

Im Beobachtungszeitraum von 2 Wochen führte dies allerdings nur zu einer tendenziellen Verbesserung der mechanischen Implantatintegration in vivo.

Aufgrund der vielversprechenden Beobachtungen in unserer präklinischen Studie, erscheint eine zeitnahe Planung erster klinischer Prüfungen von Etanercept-beschichteten porösen Polyethylen-Implantaten vielversprechend.

6 Abkürzungsverzeichnis

CAM	chorioallantoic membrane assay
CD	cluster of differentiation
cDNA	copied desoxyribonucleic acid
CT	computer tomography
DNA	desoxyribonucleic acid
d	diameter
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
e-PTFE	expanded Polytetrafluoroethylene
Etan	Etanercept
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fvd	functional vessel density
GAPDH	glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
°C	centigrade
GFCM	Growth factor containing Matrigel
GFRM	Growth factor reduced Matrigel

G	Gravitationskonstante
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IVM	intravital microscopy
KD	kilodalton
LD	Lactat-Dehydrogenase
LMU	Ludwig-Maximilian-Universität
MCP-1	Monocyte-chemoattractant-protein-1
MMP	Matrixmetalloprotease
MPEG-PCL-MPEG	methoxypoly(ethylen glycol)-poly(epsilon-caprolacton)-methoxypoly(ethylen glycol)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRT	magnetic resonance tomography
μ l	microliter
μ m	micrometer
ml	milliliter
mm	millimeter

MW	molecular weight
nm	nanometer
NaCl	sodium chloride
PBS	phosphate buffered saline
PCL	poly(epsilon-caprolacton)
PCR	polymerase chain reaction
PPE	porous polyethylene
PET	positron emission tomography
PLGA	polylactic-co-glycolic acid
ROI	region of interest
RTPCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
R6G	rhodamine 6G
rpm	rounds per minute
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TGF- β	transforming-growth-factor-beta
TNF- α	tumor-necrosis-factor-alpha

VEGF	vascular endothelial growth factor
V_{rbc}	velocity of red blood cells
W	Watt
WBex	Walter-Brendel-Zentrum of experimental medicine
XE	Xenon

7 Literaturverzeichnis

Algire, GH (1943): An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J.Natl. Cancer Inst.*, 4(1)

Apte, SH, Baz, A, Kelso, A, Kienzie, N (2008): Interferon- γ and interleukin-4 reciprocally regulate CD 8 expression in CD 8+ T-cells. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA* 105(45)

Arnaoutova, I, George, J, Kleinmann, HK, Benton, G (2009): The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20. *Angiogenesis*, 12(3), 267-74

Arpornchayanon, W, Canis, M, Suckfuell, M, Berghaus, A, Strieth, S (2010): TNF-alpha inhibitor restores cochlear microcirculation and hearing function in acute noise induced hearing loss. *manuscript*

Baez, S (1973): An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.*, 5(3), 384-394

Beerling, E, Ritsma, L, Vrisekoop, N, Derksen, P, van Rheenen, J (2011): Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J. Cell Sci.*, 124(3), 299-310

Benton, G, George, J, Kleinman, HK, Arnaoutova, I (2009): Advancing science and technology via 3D culture on basement membrane matrix. *J. of cellular physiology*, 221(1), 18-25

Berghaus, A (1985): Porous polyethylene in reconstructive head and neck surgery. *Arch.Otolaryngol.*, 111(3): 154-160

Berghaus, A, Mulch, G, Handrock, M (1984): Porous polyethylene and proplast. Their behaviour in a bony implant bed. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 240, 115-123

Berghaus, A, Stelter, K (2006): Alloplastic materials in rhinoplasty. *Curr. Opin Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 14(4), 270-277

Blaydon, SM, Shepler, TR (2003): The porous polyethylene (Medpor) spherical orbital implant: a retrospective study of 136 cases. *Ophtal. Plast. Reconstr. Surg.*, 19(5), 364-371

Bonfil, RD, Vinyals A, Bustuoabad OD, Llerens A, Benavides FJ, Gonzales-Garrigues M, Fabra A (1994): Stimulation of angiogenesis as an explantation of Matrigel-enhanced tumorigenicity. *Int. J. Cancer*, 58(2): 233-239

Brat, DJ, Bellail, AC, van Mar, EG (2005): The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-Oncology* 7(2), 122-133

Brown, NJ (2006): The dorsal skinfold chamber. *British Journal of Cancer*, 94, 101-107

Chastre, A, Belanger, E, Beauchesne, E, Bich, N, Nguyen, N, Desjardins, P, Butterworth, RF (2012): Inflammatory cascades driven by TNF-alpha play a major role in the Progression of acute liver failure and its neurological complications. *PLOS One*, 7(11):e 49670

Chishima, T, Miyagi, Y, Wang, X, *et al.* (1997): Cancer invasion and micrometastasis visualized in live tissue by green fluorescent protein expression. *Cancer Res.*, (57), 2042-2047

Chiu, YC, Cheng MH, Engel H, Kao SW, Lawson JC, Gupta S, Brey EM (2011): The role of pore size on vascularization and tissue remodeling in PEG hydrogels *Biomaterials*, 32(26), 6046-6051

Chung-Ching, C, Chin-Hang, C, Che-Chuan, W (2013): Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing early microglial expression of tumor-necrosis-factor- α . *BMC Neuroscience*, 14, 33

Colantuoni, A, Bertuglia, S, *et al.* (1984): Effects of Anesthesia on the spontaneous activity of the microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 3(1): 13-28

Dellian, M, Witwer, BP, Salehi, HA, Yuan, F, Jain, RK (1996): Quantitation and physiological characterization of angiogenic vessels in mice: effect of basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor and host microenvironment. *Am. J. Pathol.*, (149/1), 59-71

Dinareello, CA (2005): Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J.Exp.Med.*201: 1355-1359

Di Paola, R, Mazzon, E, Muia, C, Crisafulli, C, Terrona, D, Greco, S, Britti, D, Santori, D, Oteri, G, Cordasco, G, Cazzocrea, S (2007): Effects of etanercept, a tumor-necrosis-factor- α antagonist in an experimental model of periodontitis in rats. *Br. J. Pharmacol.*, 150(3), 286-297

Ehrmanntraut, S, Naumann, A, Willnecker V, Akinyomi S, Körbel C, Scheuer C, Meyer-Lindenberg A, Menger MD, Laschke MW (2012): Vitalization of porous polyethylene (medpor) with chondrocytes promotes early implant vascularization and incorporation into the host tissue. *Tissue Eng. Part*, 18(15-16), 1562-1572

Eichhorn, MF, Luedemann, S, Strieth, S, Papyan, A, Ruhsterfer, H, *et al.* (2007): Cationic lipid complexed camptothecin (EndoTAG-L) improves antitumoral efficacy by tumor vascular targeting. *Cancer Biol. Ther.*, (6/6), 920-929

Endrich, B, Asaishi, K, Gotz, A, Messmer, K (1980): Technical report – a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res. Exp. Med. (Berl.)*, 177(2), 125-134

Entela, B, Lushaj, JH, Haworth, R, Lozenschi L (2012): Intravital microscopy to study myocardial engraftment interactive. *Cardiovasc. Thorac.Surg.*, 15(1), 5-9

Erdemli, Ö, Özen, S, Keskin, D, Usanmaz, A, Batu, ED, Atilla, B, Tezcaner, A (2014): In vitro evaluation of effects of sustained anti-TNF release from MPEG-PCL-MPEG and PCL microspheres on human rheumatoid arthritis synoviocytes. *J.Biomater.Appl.*, 29(4), 524-542

Erdemli, Ö, Özen, S, Kocaefe, C, Usanmaz A, Batu ED, Atilla, B, Keskin, D, Tezcaner, A (2013): PreS-FINAL-2086: In vitro investigation of the sustained therapeutic effect of etanercept loaded microspheres on human rheumatoid arthritis fibroblast-like

synoviocytes. *Pediatr.Rheumatol.Online J.*, 11(2), 98

Ferrara, N, Winer, J, Burton, T, Rowland, A, Siegel, M, Phillips, HS, Terrell, T, Keller, GA, Levinson, AD (1993): Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to chinese hamster ovar cells. *J.Clin.Invest.*, 91(1), 160-170

Fukumura, D, Duda, DG, Munn, LL, Jain, RK (2010): Tumor Microvasculature and Microenvironment: Novel Insights Through Intravital Imaging in Pre-Clinical Models. *Microcirculation*, 17(3), 206-225

Gell, PGH, Coombs, RRA (1963): *Clinical Aspects of Immunology*, 1st ed., Section IV, 1

Genovese, T, Mazzon, E, Crisafulli, C, et al. (2005): Immunomodulatory Effects of Etanercept in an Experimental Model of Spinal Cord Injury. *JPET*, 316, 1006-1016

Gimbrone, MA, Cotran, RS, Leapman, SB, Folkman, J (1974): Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 413-427

Gosau, M, Schiel, S, Draenert, GF, Ihrler, S, Mast, G, Ehrenfeld, M (2006): Craniofacial augmentation with porous polyethylene implants (MEDPOR: first clinical results). *Mund Kiefer Gesichtschir.*, 10(3), 178-184

Haldi, M, Ton, C, Seng, WL, McGrath, P (2006): Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis*, 9, 136-151

Harris, J, Keane, J (2010): How tumor necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin.Exp.Immunol.*, 161(1), 1-9

Harris, AG, Sinitsina, I, Messmer, K (2002): Intravital fluorescence microscopy and phototoxicity: effects on leukocytes. *Eur. J. Med. Res.*, 7(3), 117-124

Herbst, H, Hübner, JH (2003): Pathologie online, Entzündung

Hughes, CS, Postovit, LM, Lajoie, GA (2010): Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, 10(9), 1886-1890

Hurley, JR, Balaji, S, *et al.* (2010): Complex temporal regulation of capillary morphogenesis by fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 299(2): C444-453

Hussain, T, Strieth, S, Berghaus, A (2013): Tissue Engineering mit porösen Polyethylenimplantaten: Effekte einer Beschichtung mit Fibroblasten auf die Integration in vivo. *manuscript*

Jones, SA (2005): Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J.Immunol.* 175: 3463-3468

Kim, HS, Park, SS, Kim, MH, Kim, MS, Kim, SK, Lee, KC (2014): Problems Associated with Alloplastic Materials in Rhinoplasty. *Yonsei Med. J.* 55(6): 1617-1623

Klyscz, T, Junger, M, Jung, F, Zeintl, H (1997): Cap image – a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed. Tech. (Berl.)*, 42(6), 168-175

Kuby, J, Kindt, TJ, Goldsby, RA, Osborne, BA (2007): Kuby immunology. *San Francisco: WH Freeman p.* 396

Laschke, MW, Elitzsch, A, Vollmar, B, Vajkoczy, P, Menger, MD (2006): Combined inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF), fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor, but not inhibition of VEGF alone, effectively suppresses angiogenesis and vessel maturation in endometriotic lesions. *Hum. Reprod.*, 21, 262-268

Laschke, MW, Harder, Y, Amon, M, Martin, I, Farhadi, J, Ring, A, *et al.* (2006): Angiogenesis in tissue engineering: breathing life into constructed tissue substitutes. *Tissue Eng.*, 12(8), 2093-2104

Laschke, MW, Haufel, JM, Thorlacijs, H, Menger, MD (2005): New experimental approach to study host tissue response to surgical mesh materials in vivo. *J Biomed Mater Res A*, 74(4), 696-704

Laschke, MW, Rucker M, Jensen, G, Carvalho, C, Mulhaupt, R, Gellrich, NC, *et al.* (2008): Incorporation of growth factor containing Matrigel promotes vascularization of porous PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 85(2), 397-407

Laschke, MW, Strohe, A, Scheuer, C, Eglin, d, Verrier, S, Alini, M, Pohlemann, T, Menger, MD (2009): In vivo biocompatibility and vascularization of biodegradable porous polyethylene scaffolds for tissue engineering. *Acta Biomater* 5(6), 1991-2001

- Lawson, ND, Weinstein, BM (2002): Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 674-682
- Lee, TS, Lim, SY, Pyon, JK, Mun, GH, Bang, SI (2010): Secondary revisions due to unfavourable results after microtia reconstruction. *J Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, 63(6): 940-946
- Lehr, HA, Leunig, M, Menger, MD, Nolte, D, Messmer, K (1993): Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am. J. Pathol.*, 143(4), 1055-1062
- Liebelt, BD, Huang, M, Baskin, DS (2015): Selar Floor Reconstruction with the Medpor Implant versus Autologous Bone after Transnasal Transphenoidal Surgery: Outcome in 200 Consecutive Patients. *World Neurosurg.* 15: 1878-8750
- Lin CI, Merley A, Sciuto TE, Li D, Dvorak AM, Meteo-Martin JM, Dvorak HF, Jaminet SC (2014): TM45F1: a new vascular therapeutic target in cancer. *Angiogenesis Jul.2*
- Martin, TA, Harding, KG, *et al.* (1999): Regulation of angiogenesis and endothelial cell motility by matrix-bound fibroblasts. *Angiogenesis* 3(1): 69-76
- Massberg, S, Eisenmenger, S, Enders, G, Krombach, F, Messmer, K (1998): Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res. Exp. Med.*, 198(1), 23-35
- Mendelsohn M. (2005): Straightening the crooked middle third of the nose: using porous polyethylene extended spreader grafts. *Arch. Facial Plast. Surg.*, 7, 74-80
- Menger, MD, Hammersen, F, *et al.* (1992): In vivo assessment of neovascularization and incorporation of prosthetic vascular biografts. *Thorac Cardiovasc Surg* 40(1): 19-25
- Menger, MD, Lehr, HA (1993): Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol. Today*, 14(11), 519-522
- Messmer, K, Krombach, F (1998): Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg* 69(4): 333-338
- Misharin, AV, Haines, K, Rose, S, Gierut, A, Hotchkiss, RS, Perlman, H (2012): Development of a new humanized mouse model to study acute inflammation arthritis. *J. Transl. Med.* 10(1), 190

Muthukkaruppan, V, Auerbach, R (1979): Angiogenesis in the mouse cornea. *Science*, 205, 1416-1418

Narges, B, Sataru, N, Chul, P, Gordon, HW, Reinisch, J, Kasrai, L (2014): Auricular reconstruction of microtia: A review of available methods. *Plast. Surg.* 22(1): 39-43

Newman, AC, Nakatsu, MN, Chou, W, Gershon, PD, Hughes, CCW (2011): The requirement for fibroblasts in angiogenesis: fibroblast-derived matrix proteins are essential for endothelial cell lumen formation. *Mol.Biol.Cell* 22(20): 3791-3800

Niechajev, I (2012): Facial reconstruction using porous high-density polyethylene (Medpor): long-term results. *Aesthetic Plast. Surg.*, 36(4), 917-927

Olejniczak, K, Kasprzak, A (2008): Biological properties of interleukin 2 and its role in pathogenesis of selected diseases – a review. *Med.Sci.Monit.*, 14, 179-189

Papenfuss, HD, Gross, JF, Intaglietta, M, Trecse, FA (1979): A transparent access chamber for the rat dorsal skinfold. *Microvasc. Res.*, 18(3), 311-318

Perez-Polo, JR, Rea, HC, Johnson, KM, Parsley, MA, Unabia, GC, Xu, GY, Prough, D, DeWitt, DS, Paulucci-Holthauzen, AA, Werrbach-Perez, K, Hulsebosch, CE (2015): Inflammatory cytokine receptor blockade in a rodent model of mild traumatic brain injury. *J.Neurosci.Res.* 10.1002/jnr.23617

Purdy, EP (1997): Oculoplastic and orbital applications of porous high-density polyethylene implants. *Curr.Opin.Ophthalmol.*, 8(5), 57-63

Rahman, MM, McFadden, G (2006): Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PloS Pathog.* 2, 2

Rivest, S (2000): How the Blood Talks to the Brain Parenchyma and the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus During Systemic Inflammatory and Infectious Stimuli. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, 223(1), 22-38

Roh, M, Zhang, Y, Murakami, Y, Lee, SC, *et al.*, (2012): Etanercept, a widely used inhibitor of tumor necrosis factor- α , prevents retinal ganglion cell loss in a rat model of glaucoma. *PLOSONe* 7(7):e40065

Rücker, M, Laschke, MW, Junker, D, Carvalho, C, Schramm, A, Mulhaupt, R, et al. (2006): Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice. *Biomaterials*, 27(29), 5027-5038

Ryden L, Molnar D, Esposito M, Johansson A, Suska F, Palmquist A, Thompson P (2013): Early inflammation response in soft tissues induced by thin calcium phosphates. *J Biomed Material Res A* 101(9): 2712-2717

Saetzler, R, Jallo, J, et al. (1997): Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45(4): 505-513

Sandison, J (1924): A new method for the microscopic study of living growing tissue by introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat. Rec.*, 28, 281-287

Scafani, AP, Romo, T, Silver, L (1997): Clinical and histological behaviour of exposed porous high-density polyethylene implants. *Plast. Reconstr. Surg.* 99(1):41-50

Scafani, AP, Thomas JR, Cox AJ, Cooper MH (1997): Clinical and histologic response of subcutaneous expanded polytetrafluoroethylene (Gore-Tex) and porous high-density polyethylene (Medpor) implants to acute and early infection. *Arch Otolaryngol. Head Neck Surg.* 123(3): 328-336

Scherer, EQ, Yang, J, Canis, M, Reimann, K, Ivanov, K, Diehl, CD, Backx, P, Wier, WG, Srieth, S, Wangemann, P, Voigtlaender-Bolz, J, Lidington D, Bolz, SS (2010): TNF- α enhances microvascular tone and reduces blood flow in the cochlea via enhanced S1P signaling. *Stroke*, 41(11), 2618-2624

Singh, JA, Christensen, R, Wells, GA (2009): Biologics for rheumatoid arthritis: an overview of Cochrane reviews. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 4

Sky, TH, Britton, GJ (2013): Regulation of Adaptive Immunity: The Role of Interleukin-10. *Frontiers in Immunology* 4

Staton, CA, Reed, MWR, Brown, NJ (2008): A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.*, 90(3), 195-221

Steinbauer, M, Harris, AG, Abels, C, Messmer, K (2000): Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch. Surg.*, 385(4), 290-298

Stelter, K, Strieth, S, Berghaus, A (2007): Porous polyethylene implants in revision rhinoplasty: chances and risks. *Rhinology*, 45(4), 325-331

Stoletov, K, Montel, V, Lester, RD, Gomas, SL, Klemke, R (2007): High resolution imaging of the dynamic tumour cell-vascular interface in transparent zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 17406-17411

Strieth, S, von Johnston, V, Eichhorn, ME, Enders, G, Krasnici, S, Thein, E, *et al.* (2005): A new animal model to assess angiogenesis and endocrine function of parathyroid heterografts in vivo. *Transplantation*, 79(4), 392-400

Strieth, S, Weger, T, *et al.* (2010): Biocompatibility of porous polyethylene implants tissue-engineered by extracellular matrix and VEGF. *J Biomed Mater ResA*, 93(4): 1566-1573

Teichgraeber JF, Spector M, Per-Lee JH, Jackson RT (1983): Tissue response to Plasti-Pore and Proplast otologic implants in the middle ears of cats. *Am.J.Otol.*, 5(2), 127-136

Thiel, DJ, le Du, MH, Walter, RL, D'Arcy, A, Chene, S, Fountoulakis, M, Gurotta, G, Winkler, FK, Ealick, SE (2000): Observation of an unexpected third receptor molecule in the crystal structure of human interferon- γ receptor complex. *Structure* 8(9): 927-936

Uehara F, Tome Y, Reynoso J, Mii S (2013): Color-coated imaging of spontaneous vessel anastomosis in vivo. *Anticancer Res.*, 33(8), 3041-3045

University of Minnesota (2009): Facial Vein Technique. Research animal resources

Vajkoczy, P, Menger, MD, Simpson, E, Messmer, K (1995): Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation*, 60(2), 123-127

Vajkoczy, P, Ullrich, A, *et al.* (2000): Intravital fluorescence videomicroscopy to study tumor angiogenesis and microcirculation. *Neoplasia*, 2 (1-2): 53-61

Venegas-Pont, M, Manigrosso, MB, Crifoni, SC, La Marca, BB, Maric, C, Racusen, LC, Glover, PH, Jones, AV, Drummond, HA, Ryan, MJ (2010): The TNF-alpha antagonist etanercept decreases blood pressure and protects the kidney in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *Hypertension*, 56(4), 643-649

Vollmar, B, Laschke MW, Rohan, R, Koenig, J, Menger, MD (2001): In vivo imaging of

physiological angiogenesis from immature to preovulatory ovarian follicles. *Am. J. Pathol.*, 159(5), 1661-1670

Vollmar, B, Schmits, R, Kunz, D, Menger, MD (2001): Lack of in vivo function of CD31 in vascular thrombosis. *Thromb. Haemost.*, 85(1), 160-164

Wagner, R (1839): Erleuterungstafeln zur Physiologie und Entwicklungsgeschichte. *Leipzig, Germany: Leopold Voss*

Wellisz, T (1993): Clinical experience with the Medpor porous polyethylene implant. *Aesthetic Plast. Surg.*, 17(4), 339-344

Wood, SJ (1958): Pathogenesis of metastasis formation observed in vivo in the rabbit ear chamber. *AMA Arch. Pathol.*, 66, 550-568

Xu, C, Inokuma, MS *et al.* (2001): Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, 19(10), 971-4

Yang JH, Hu J, Wan L, Chen LJ (2014): Barbigeronone inhibits tumor angiogenesis, growth and metastasis in melanoma. *Asian Pac J Cancer Prev.*, 15(1), 167-174

Yaremchuk, MJ (2003): Facial skeletal reconstruction using porous polyethylene implants. *Plast Reconstr Surg*, 111(6), 1818-1827

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilian-Universität München im Zeitraum von Februar 2009 bis September 2012 durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich noch bei einigen Personen bedanken, die einen wesentlichen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Mein herzlichster Dank gilt Prof. Dr. med. S. Strieth für die Überlassung des Themas, für viele kreative Verbesserungen und Erweiterungen der Versuchsreihe, für ständige Erreichbarkeit und exzellente Betreuung.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. B. Summer vom allergologischen Forschungslabor der Dermatologie für die Durchführung der Serum- und Gewebeanalysen und die Hilfe beim Material- und Methodenteil bedanken.

Mein Dank geht auch an Frau Dr. rer. biol. hum. S. Scheckinger und an Frau Dr. med. D. Gellrich für ihre Unterstützung beim Erlernen der Technik der Rückenhautkammerpräparation und für viele hilfreiche Hinweise bei der digitalen Bildanalyse. Auch bei Herrn Dr. rer. nat. J. Peters möchte ich mich sehr bedanken für die Erreichbarkeit und Hilfestellungen bei der digitalen Datenanalyse.

Ich möchte mich bei Frau Dr. rer. nat. H. Beck bedanken für technische Hilfestellungen bei der tierexperimentellen Blutentnahme.

Außerdem möchte ich mich bei allen Doktorand(inn)en der Arbeitsgruppe bedanken für die kollegiale und konstruktive Atmosphäre.

Zum Schluss möchte ich mich für Zuspruch und Aufmunterung bei meiner Familie bedanken und für Feste und geselliges Beisammensein bei allen Freunden und Weggefährten in einer oft sehr stressigen Lebensphase.

Eidesstattliche Versicherung

Ditz, Franziska Maria Sophia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

***Tissue Engineering* mit porösen Polyethylenimplantaten:**

Effekte einer Beschichtung mit Etanercept auf die Integration *in vivo*

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Bad Boll, den 12.07.18

.....
Ort, Datum

Franziska Ditz

.....
Unterschrift Doktorandin/Doktorand